



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MOŽNOSTI PŘÍPRAVY NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN S  
ANTIMIKROBIÁLNÍ SLOŽKOU**

PREPARATION OF NANOPARTICLES AND NANOFIBERS WITH ANTIMICROBIAL COMPONENTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Simona Sosková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0990/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Simona Sosková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Možnosti přípravy nanočástic a nanovláken s antimikrobiální složkou

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) příprava nanočástic a nanovláken z vybraných přírodních polymerů
- 2) funkcionizace připravených částic a vláken antimikrobiálními látkami
- 3) charakterizace účinku částic a vláken na mikroganismy a humánní buňky

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Simona Sosková  
student(ka)

-----  
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Diplomová práca bola zameraná na prípravu nových materiálov s antimikrobiálnym účinkom. V práci boli pripravené lipozómové častice a nanovlákná z polyhydroxybutyrátu (PHB) s obsahom klotrimazolu a rastlinných extraktov s vysokými antioxidačnými a antifungálnymi účinkami.

Teoretická časť popisuje použitia nanočastíc a nanovláknien v medicíne a kozmetike, priaznivé účinky rastlín s potenciálnym antimykotickým účinkom a metódy pre charakterizáciu častíc a vláknien.

V praktickej časti boli pripravené vodné a lipidové rastlinné extrakty, spektrofotometricky charakterizované na obsah polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu. Z vybraných extraktov boli ďalej pripravené lipozómy a lipozómy s obsahom PHB. Častice boli testované z hľadiska enkapsulačnej účinnosti a ich krátkodobej a dlhodobej stability. Metódou DLS bola stanovená ich veľkosť a meraním zeta potenciálu ich koloidná stabilita. Pomocou elektrospinningu a forcespinningu boli taktiež pripravené PHB vlákna s obsahom vybraných extraktov a klotrimazolu. Vlákna boli podrobené analýze FLIM, FTIR-ATR, testom antioxidačnej aktivity a testovaniu krátkodobej i dlhodobej stability. Antimykotický účinok testovaných extraktov, častíc a vláknien bol stanovený na kultúre *Candida glabrata*. Na záver bola vykonaná charakterizácia účinku častíc a vláknien na humánne bunky.

## **Kľúčové slová**

prirodné extrakty, lipozómy, nanovlákná, polyhydroxybutyrát, *Candida*, keratinocyty

## **Abstract**

The presented diploma thesis is focused on the preparation of new materials with antimicrobial effect. Liposomes and nanofibers from polyhydroxybutyrate containing clotrimazole and natural extracts with good antifungal and antioxidant effects were prepared.

The theoretical part contains examples and short description of using nanoparticles and nanofibers in cosmetics and medicine and the description of plants which have positive and potential antimycotic effects. Moreover, methods for particles and fibers characterisation were shortly described.

In the experimental part, natural water and lipid extracts were prepared and spectrophotometrically characterised for the content of polyphenols, flavonoids and the antioxidant activity. Liposomes and liposomes containing PHB were prepared from selected extracts and the encapsulation effectivity, shortterm and longterm stability via determination of polyphenols were determined. Prepared particles were characterized with DLS method (size) and zeta- potential (stability). PHB nanofibers functionalised with selected lipid extracts and clotrimazole were prepared via electrospinning and forcespinning, and examined via FLIM and FTIR-ATR methods and spectrophotometry was used for antioxidant activity and release of active substances determination. Antifungal properties of prepared particles, extracts and fibers using the test system *Candida glabrata* were studied. Finally, cytotoxicity of selected samples was tested with MTT assay using human ceratinocytes.

## **Keywords**

natural extracts, liposomes, nanofibers, polyhydroxybutyrate, *Candida*, keratinocytes

SOSKOVÁ, S. *Možnosti přípravy nanočástic a nanovláken s antimikrobiální složkou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## **Pod'akovanie**

Týmto by som chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce, Ing. Petre Matouškovej, Ph. D. za ochotu, mnoho cenných praktických rád a pomoci pri meraní. Ďalej ďakujem konzultantke mojej práce, pani prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za inšpiráciu a ľudský prístup. V neposlednom rade ďakujem taktiež rodičom za umožnenie štúdia a priateľovi za trpezlivosť a podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	Teoretická časť .....	11
2.1	Lipidové častice v medicíne a kozmetike .....	11
2.2	Nanovlákná v medicíne a kozmetike .....	11
2.3	PHB .....	12
2.4	Príprava nanovláknien pomocou elektrospinningu .....	12
2.5	Príprava nanovláknien pomocou forcespinningu .....	13
2.6	Mykotické ochorenia.....	14
2.7	<i>Candida glabrata</i> .....	16
2.8	Syntetické liečivá pre liečbu mykóz .....	17
2.8.1	Klotrimazol .....	17
2.9	Antimykotický gel s obsahom nanočastíc.....	17
2.10	Prírodné extrakty s antimykotickým účinkom .....	18
2.10.1	Antioxidačná aktivita .....	18
2.10.2	Polyfenoly a flavonoidy .....	18
2.10.3	Oregano.....	18
2.10.4	Peper .....	19
2.10.5	Lapacho.....	19
2.10.6	Kapucínka .....	20
2.10.7	Pomarančová kôra.....	20
2.10.8	Dubová kôra.....	21
2.10.9	Muškatový oriešok.....	21
2.10.10	Kozinec blanitý .....	22
2.10.11	Klinček.....	22
2.10.12	Škorica .....	22
2.10.13	Zázvor .....	23
2.10.14	Badyán .....	23
2.11	Keratinocyty .....	24
2.11.1	MTT test.....	24
2.12	Charakterizácia častíc.....	25
2.12.1	DLS .....	25
2.12.2	Zeta potenciál.....	25
2.13	Charakterizácia vlákien.....	25
2.13.1	FLIM.....	25

2.13.2	FTIR ATR .....	26
3	Cieľ práce .....	27
4	Experimentálna časť .....	28
4.1	Použité mikroorganizmy .....	28
4.2	Použité humánne bunky .....	28
4.3	Použité štandardné chemikálie .....	28
4.3.1	Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovenie .....	28
4.3.2	Chemikálie použité na prípravu častíc a vlákien .....	28
4.3.3	Chemikálie použité na kultiváciu <i>Candida glabrata</i> .....	28
4.3.4	Chemikálie použité na kultiváciu keratinocytov a MTT testy .....	28
4.3.5	Chemikálie použité na stanovenie antioxidačnej aktivity .....	29
4.3.6	Ďalší použitý materiál .....	29
4.4	Prístroje a pomôcky .....	29
4.5	Príprava extraktov .....	29
4.5.1	Vodné extrakty .....	29
4.5.2	Lipidové extrakty – extrakcia podľa Folcha .....	29
4.6	Stanovenie antioxidačnej aktivity extraktov .....	30
4.7	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie polyfenolov .....	30
4.8	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie flavonoidov .....	30
4.9	Charakterizácia vybraných extraktov pomocou GC/FID .....	30
4.9.1	Transesterifikácia lipidov .....	30
4.9.2	Analýza GC/FID .....	30
4.10	Príprava lipozómov .....	31
4.10.1	Príprava lipozómov z vodných extraktov .....	31
4.10.2	Príprava lipozómov z lipidových extraktov .....	31
4.11	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov .....	31
4.12	Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS .....	31
4.13	Stanovenie stability častíc pomocou zeta potenciálu .....	31
4.14	Štúdium krátkodobej stability častíc .....	31
4.15	Štúdium dlhodobej stability častíc .....	32
4.16	Príprava PHB vlákien .....	32
4.16.1	Pomocou rotačného zvlákňovacieho prístroja .....	32
4.16.2	Pomocou elektrospinningu .....	32
4.17	Antioxidačná aktivita vlákien .....	32
4.18	Štúdium krátkodobej stability vlákien .....	32

4.19	Štúdium dlhodobej stability vlákien .....	32
4.20	Štúdium vlákien pomocou fluorescenčnej mikroskopie technikou FLIM.....	32
4.21	Charakterizácia vlákien pomocou FTIR-ATR .....	33
4.22	Kultivácia <i>Candida glabrata</i> .....	33
4.22.1	Živné média .....	33
4.23	Antimykotické testy .....	33
4.23.1	Skúmavkový test.....	33
4.23.2	Agarový difúzny test.....	33
4.23.3	Dilučné testy .....	34
4.24	Testy cytotoxicity na bunkách ľudskej pokožky.....	34
4.24.1	Kultivácia keratinocytov .....	34
4.24.2	MTT test.....	34
4.24.3	Stewartova metóda stanovenia koncentrácie lipidov .....	35
5	Výsledky a diskusia .....	36
5.1	Charakterizácia rastlinných extraktov .....	36
5.1.1	Obsah polyfenolov v extraktoch .....	36
5.1.2	Obsah flavonoidov v extraktoch .....	37
5.1.3	Antioxidačná aktivita extraktov .....	38
5.1.4	Antimykotická aktivita extraktov .....	39
5.1.5	Výťažnosť lipidových extraktov .....	40
5.1.6	Obsah mastných kyselín stanovených pomocou GC/FID .....	41
5.2	Príprava častíc .....	41
5.2.1	Veľkosť častíc .....	41
5.2.2	Enkapsulačná účinnosť .....	42
5.2.3	Krátkodobá stabilita častíc .....	44
5.2.4	Dlhodobá stabilita častíc .....	45
5.3	Koloidná stabilita častíc v roztoku .....	45
5.4	Príprava vlákien .....	46
5.5	Charakterizácia vlákien s obsahom lipidových extraktov.....	47
5.5.1	Antioxidačná aktivita vlákien .....	47
5.5.2	Krátkodobá stabilita vlákien .....	48
5.6	Dlhodobá stabilita vlákien.....	53
5.6.1	FLIM analýza vlákien .....	54
5.7	FTIR ATR .....	56
5.8	Antimykotické testy pripravených častíc a vlákien .....	57



5.8.1	Antimykotické testy častíc .....	57
5.8.2	Antimykotické testy vlákien .....	58
5.9	MTT testy cytotoxicity na keratinocytoch .....	58
5.9.1	Test lipozómov.....	59
5.9.2	Test PHB vlákien .....	61
6	ZÁVER.....	63
7	Použitá literatúra.....	65
8	Zoznam použitých skratiek.....	71
9	Prílohy .....	72
9.1	GC/FID spektrá .....	72
9.2	FLIM analýza vlákien .....	74

## 1 ÚVOD

V bežnom živote sa stretávame s množstvom predmetov dennej potreby, ktoré sú na báze nanomateriálov. V kozmetike sú to napríklad nanočastice oxidu zinku, ktoré sa používajú vo výrobe deodorantov, alebo titánu, ktoré sú súčasťou opaľovacích krémov. Ďalej je nanotechnológia využívaná v produktoch pre vlasovú starostlivosť a zvlhčujúcich krémoch. Výhodou nanočastíc v krémoch a šampónoch je, že dokážu účinné látky preniesť hlbšie do pokožky alebo vlasov. Menej známe je využitie v parfémoch. Nanotechnológia pomáha dosiahnuť čistejšie vône, postupné uvoľňovanie alebo pohlcovanie pachov.

V medicíne nachádzajú nanotechnológie široké uplatnenie, napríklad v krytí rán. Môžu obsahovať začlenené aditíva, napríklad antibakteriálne látky alebo iné terapeutiká. Podporujú rast tkaniva a vylučujú formáciu jaziev. Nanovláknenné membrány majú obvykle veľkosť pórov od desiatok po stovky nanometrov, sú teda dostatočne malé, aby chránili ranu pred prienikom baktérií. Veľký merný povrch je účinný pre sorpciu kvapalín. Mali by udržiavať vhodnú vlhkosť hojenia, ľahko sa aplikovať a odstraňovať z rany. Práve kôli silnej kontaminácii chronických rán je potrebné, aby kryty rán mali širokospektrálnu antimikrobiálnu aktivitu. Cieľom vývoja nanovláknien je poskytnúť ideálnu štruktúru, ktorá by mala nahradiť prirodzenú extracelulárnu maticu. Veľmi významnou oblasťou sú i kontrastné látky pre nukleárnu magnetickú rezonanciu, kde sa využívajú prevažne nanočastice oxidov. Hudbou budúcnosti sú napríklad nanosenzory, ktoré v ľudskom tele môžu sledovať, kedy diabetik potrebuje svoju dávku inzulínu, alebo nanoroboty, ktoré budú schopné opravovať v ľudskom tele poškodené orgány.

V poslednej dobe je veľmi rozšírené užívanie širokospektrálnych antibiotík. To má za následok zvýšenie počtu mykotických ochorení, ktoré sú spôsobené hubami a patogénnymi kvasinkami. Je teda zaznamenaný zvýšený dopyt po antifungálnych látkach. K prírodným antimykotickým látkam sa zaraďujú napríklad tymol, allicin alebo eugenol, ktoré nájdeme v rade rastlinných extraktov. Byliny a rastliny sa odjakživa používali pri liečbe rôznych ochorení i vďaka ich antimikrobiálnemu pôsobeniu. Zároveň posilňujú ľudský organizmus a dodávajú mu množstvo hodnotných živín. Sú preverené mnohými generáciami užívania a sledovania ich účinkov. Príprava extraktov, či už vodných alebo bylinných olejov zvyšuje koncentráciu účinných látok z bylín, a tak aj ich antioxidačné, antimikrobiálne alebo protizápalové priaznivé pôsobenie. Takisto významný vplyv na zvýšenie ich účinku môže mať využitie nanotechnológie.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Lipidové častice v medicíne a kozmetike

Lipidové nanočastice boli skúmané pre rôzne farmaceutické aplikácie - parentálne, perorálne, dermálne, očné a pľúcne podanie. V priebehu poslednej dekády boli tieto nanočastice intenzívne študované pre dermálne použitie, nie len farmaceutické, ale aj kozmetické. V literatúre je popísaných mnoho spôsobov produkcie lipidových nanočastíc. Medzi ne patria vysokotlaková homogenizácia, mikroemulzná technika, odparovanie rozpúšťadla, vstrekovanie rozpúšťadla, fázová inverzia, ultrasonikácia a mnohé iné. Technologické aspekty formulácie lipidových nanočastíc pre dermálnu aplikáciu vo farmaceutickom a kozmetickom odvetví sú veľmi podobné, ak nie rovnaké, napríklad inkorporácia aktívnych látok do častíc, zabudovanie častíc do krémov, alebo ich stabilita v krémoch. Trvanie vývoja a uvedenie na trh je ale pri kozmetických prípravkoch omnoho kratšie, pravidlá a regulácie zavedenia farmaceutického produktu na trh sú viac komplexné. Preto bol prvý produkt obsahujúci lipidové nanočastice kozmetický [1][2].

Lipidové nanočastice sú koloidné nosiče, ktoré umožňujú riadené uvoľňovanie mnohých látok. Sú zložené z fyziologických a biodegradabilných lipidov, ktoré vykazujú nízku toxicitu a cytotoxicitu, to znamená, že sú výborne tolerované. Malé rozmery zaistia blízky kontakt s rohovinovou vrstvou pokožky a môžu zvýšiť množstvo liečiva, ktoré penetruje do pokožky. Vďaka ich okluzívnym vlastnostiam je pozorovaná zvýšená hydratácia pokožky. Sú taktiež schopné vylepšiť chemickú stabilitu látok citlivých na svetlo, oxidáciu alebo hydrolýzu. Toto zlepšenie vlastností po inkorporácii do lipidových nanočastíc už bolo dokázané pri mnohých kozmetických aktívnych látkach, napríklad koenzým Q10, askorbyl palmitát, vitamín E alebo vitamín A. Pri zdravej pokožke obsahuje rohovinová vrstva 20 % vody a poskytuje relatívne efektívnu bariéru proti kožnej absorpcii exogénnych látok. Oklúzia (uzatvorenie, pokrytie) kože môže zvýšiť hydratáciu rohovinovej vrstvy a takto ovplyvniť kožnú absorpciu [1].

Povrchová liečba kožných chorôb má tú výhodu, že kožným podaním sú redukované systémové nežiaduce účinky v porovnaní s orálnym alebo parenterálnym podaním liekov. Pri kožnej aplikácii sú ale problémy s kontrolovaním a presným určením množstva lieku, ktorý prenikol do rozličných vrstiev kože. Lipidové nanočastice boli skúmané pre zlepšenie kožných chorôb, ako napríklad atopický ekzém, psoriáza, akné, kožná mykóza alebo zápaly. Taktiež je možné eliminovať gastrointestinálne vedľajšie účinky pomocou povrchovej antireumatickej liečby. Vo výskume použitia lipidových nanočastíc sú momentálne napríklad glukokortikoidy, retinoidy, nesteroidné protizápalové látky alebo antimykotiká [1][2].

### 2.2 Nanovlákná v medicíne a kozmetike

S rýchlym rozvojom nanotechnológie exponenciálne rastie aj výskum nanovláknien, obzvlášť nanovláknien pripravených pomocou elektrospinningu. Tieto vlákna majú nízku hmotnosť s vysokým pomerom povrch - objem, nastaviteľnú morfológiu a priemer vláknien a dobre kontrolovateľnú funkcionálnu. Toto všetko ich robí veľmi dôležitým materiálom s mnohými aplikáciami. Značná pozornosť je venovaná zlepšeniu efektívnosti kontroly štruktúry nanovláknien v procese elektrospinningu a hľadaniu ich unikátnych vlastností a nových aplikácií [3].

Najnovším trendom je príprava takzvaných minitabliet z nanovláknien. Pevné orálne tablety vyrobené tradičnými jednotkovými operáciami majú limitovanú flexibilitu dávky liečiva. Personalizovaná medicína ponúka terapiu ušitú na mieru pacientovi tak, že zohľadňuje vek, výšku, váhu, pohlavie, štádium choroby alebo chovanie pacienta [4].

Potrebu takejto medicíny pociťujú hlavne pediatrickí pacienti a starší ľudia. Minitablety sú malé, pevné tablety, ktoré majú v priemere 3 mm. Štúdie dokázali, že pediatrickí pacienti od veku 6 mesiacov sú schopní tieto tablety prehĺtať. Boli pripravené minitabliety obsahujúce Prednison, liek vo vode nerozpustný, ktorý bol zabudovaný do povidonových (polyvinylpyrrolidon, PVP) vlákien pri procese elektrospinningu [4].

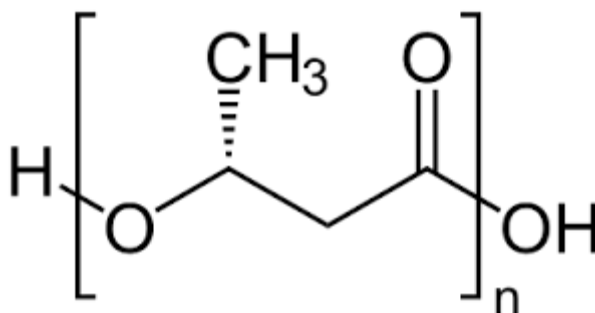
Ďalším možným využitím nanovláken v medicíne je krytie rán. Kryty rán a popálenín z biomateriálov by mali byť schopné absorbovať exudát z rany, poskytovať vhodné prostredie pre rast tkaniva, zabráňovať bakteriálnej infekcii a degradovať vhodnou rýchlosťou. V poslednom čase sa ako veľmi sľubné ukázali práve kryty rán z degradovateľných biomateriálov pripravené pomocou elektrospinningu, a to vďaka ich schopnosti degradovať (po použití), veľkému mernému povrchu a možnosti optimalizácie a zlepšovania tak, aby poskytovali vhodné prostredie pre rast živých buniek a prevencii rastu patogénov [5].

Čo sa týka materiálov, najčastejšie sú využívané chitozán, želatína, polyuretany, algináty – vlhké krytie, polykaprolaktón, polyvinyl alkohol, PLGA, polyetylén oxid PEO, karboxymethyl celulóza, kyselina polymliečna alebo PHB.

### 2.3 PHB

Poly-(3-hydroxybutyrát) je polyester syntetizovaný ako uhlíková a energetická rezerva mnohých baktérií. Pre tento polymér sú charakteristické termo-plastické vlastnosti podobné plastom petrochemického priemyslu, ako polyetylén alebo polypropylén. PHB je intertný, biokompatibilný materiál, ktorý má mnoho možností využitia v medicínskych a biomedicínskych aplikáciách. Súčasne je len málo druhov baktérií využívaných pre produkciu PHB na priemyselnej úrovni, a to *Cupravidus necator*, *Azohydromonas lata* a rekombinantná *Escherichia coli* [6].

PHB je úplne rozložiteľný a je predmetom záujmu technológií bioprosesov. Hlavné aplikácie sú možné v potravinárskom priemysle, agrikultúre, farmácii a medicíne a taktiež slúži PHB ako surový materiál pre produkciu čistých chemikálií alebo v náterovom priemysle. Súčasne je hlavným problémom, ktorý limituje rozšírenie používania PHB jeho vysoká cena v porovnaní s polymérmi petrochemického priemyslu [7].

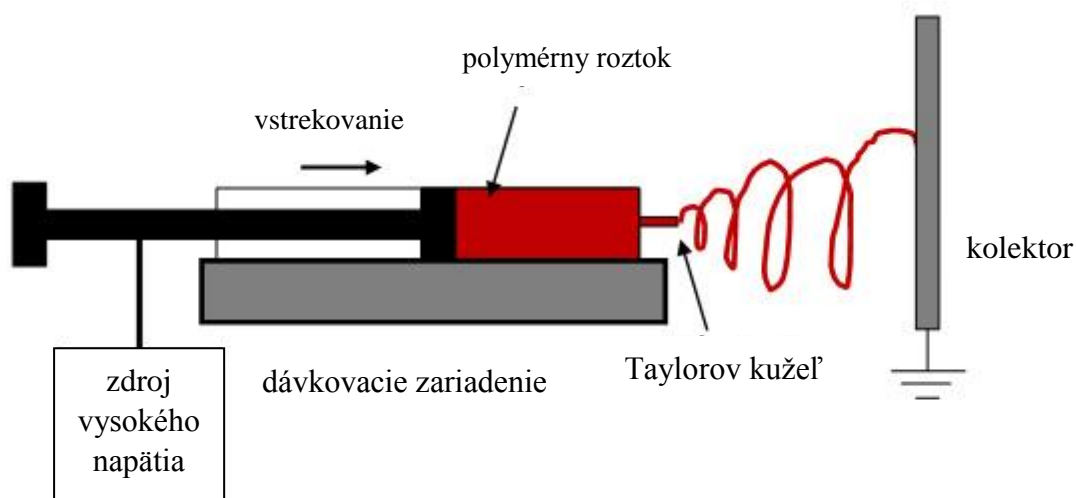


Obrázok 1: Chemická štruktúra PHB

### 2.4 Príprava nanovláken pomocou elektrospinningu

Elektrospinning je proces v ktorom sú z roztoku polyméru produkované tenké polymérne vlákna pôsobením elektrostatickej sily. Systém pre elektrospinning pozostáva z troch komponentov - zdroj vysokého napätia, ihla pripojená na striekačku a kovový kolektor (Obrázok 2). Zdroj napätia zavádza vysoký elektrický potenciál medzi ihlu a uzemnený kovový kolektor. Na začiatku vytvorí roztok polyméru kvapku na konci ihly z dôvodu povrchového napätia. Po zapojení elektrického potenciálu sa kvapka polymérneho roztoku predĺži a vyformuje Taylorov kužeľ [8].

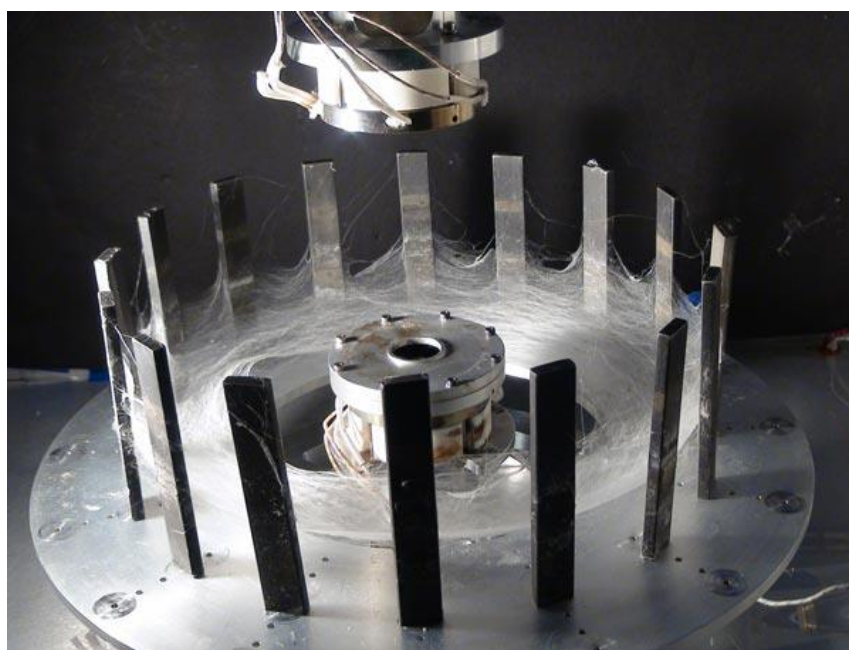
Zvýšenie elektrického potenciálu prekoná povrchové napätie a spôsobí vytvorenie polymérneho prúdu smerom ku kovovému kolektoru. Prúd polyméru sa zakoncentruje odparením rozpúšťadla a v pevnom skupenstve sa zachytáva na kolektore [8].



Obrázok 2: Schéma elektrospinningu [9]

## 2.5 Príprava nanovlákien pomocou forcespinningu

Forcespinning je technológia, ktorá využíva odstredivú silu vzniknutú externým pôsobením pre produkciu vlákien mikro- a nano rozmerov z rôznych druhov tavenín a roztokov. Umožňuje produkciu nanovlákien z veľkého množstva materiálov s dôležitými možnosťami technologických aplikácií. Výhoda tejto techniky je vysoká rýchlosť produkcie a taktiež aplikovateľnosť na materiály ako polyméry, kompozity, kovy alebo keramika [10].



Obrázok 3: Forcespinning [11]

## 2.6 Mykotické ochorenia

S mykózami, tj. invazívnymi infekciami vyvolanými mikroskopickými hubami, sa lekári stretávajú pomerne často. Väčšinou sa jedná o menej závažné ochorenia slizníc alebo kože, vzácnejšie sú hlboké mykózy postihujúce vnútorné orgány alebo celé orgánové systémy. Etiologicky sa uplatňuje rada zástupcov dvoch základných morfológických foriem mikromycét, tj. kvasinkových a vláknitých húb. Z kvasinkových mikroorganizmov spôsobujú mykózy najčastejšie príslušníci rodu *Candida*. S najvyššou frekvenciou bol izolovaný druh *C. albicans*, bežne sa vyskytujú i *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. krusei*. Slizničné infekcie sa najčastejšie nachádzajú v dutine ústnej. Svojim vzhľadom je typický akútny zápal, známy ako soor, ktorý postihuje hlavne novorodencov, staré osoby, pacientov trpiacich závažným ochorením (AIDS, zhubné nádory) a prejavuje sa bielymi pseudomembránami, obvykle na jazyku. Naopak klinický obraz ostatných foriem je väčšinou necharakteristický. Najčastejšia je chronická atrofická kandidóza, prítomná u 60 % ľudí so zubnou protézou. *Candidy* často vyvolávajú zápal i na vulvovaginálnej sliznici, aspoň jednu epizódu prekoná počas života až 75 % žien, najčastejšie behom tehotenstva. V širšom slova zmysle ide o pohlavne prenosné ochorenie. Na koži spôsobujú *Candidy* intertrigo, mokvajúce plochy lokalizované najčastejšie v slabinách. Candidové onychomykózy tvoria 5 až 10 % všetkých infekcií nechtovej platničky. Najzávažnejšiu formu povrchovej mykotickej infekcie predstavuje chronická mukokutánná kandidóza. Je dôsledkom vrodenej poruchy aktivácie T-lymfocytov, tvorby faktorov potrebnej k aktivácii makrofágov alebo niektorých endokrinných ciest a prejavuje sa ťažkými perzistentnými infekciami kože, nechtov a slizníc spôsobených *C. albicans* [12].



Obrázok 4: *Candida albicans* [13]

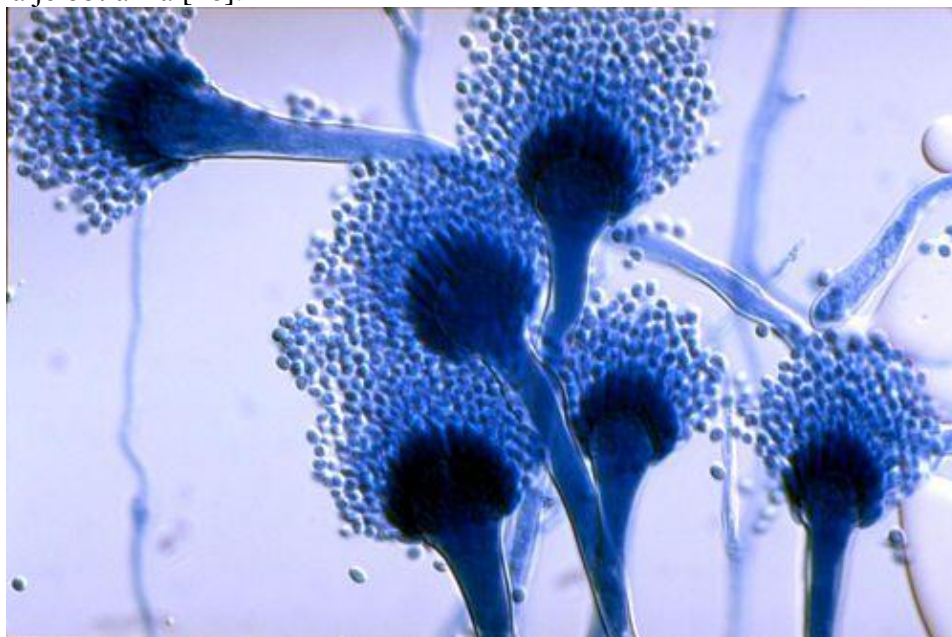
Systémové kandidózy sú klinicky podstatne horšie diagnostikovateľné, spravidla ich nie je možné odlíšiť od iných infekčných chorôb. Postihnuté môžu byť rôzne patrie tráviaceho traktu (ezofagitída, gastritída, intestinálna kandidóza). Pľúcne infekcie sú obvykle dôsledkom hematogénneho rozsevu, a pretože nemajú ani špecifický rádiologický nález, bývajú v priebehu života pacienta preukázané len zriedka. Taktiež väčšina prípadov ochorení ľadvín vzniká na základe šírenia kvasiniek krvným obehom, uvádza sa, že renálna infekcia býva zistená až u 80 % pacientov s rozšírenou formou nákazy [14].

Kandidóza dolných močových ciest sa objavuje obvykle v dôsledku zavedeného močového katétru alebo v súvislosti s cukrovkou. Kvasinky sú ďalej najčastejšími mykotickými agens endokarnitíd, môžu byť však príčinou taktiež myo- a perikarditíd. Endoftalmitídou, ktorá môže viesť až k slepote, trpia so stúpajúcou frekvenciou intravenózne narkomani. Vzácne sa vyskytuje kandidová meningitída, osteomyelitída a artritída, často ako dôsledok hematogénnej infekcie [15].

Tá sa môže prejavovať ako jednoduchá kandidémia, často spojená so zavedeným venóznym katétrom, alebo ako akútna či chronická rozšírená kandidóza. Kvasinkové infekcie majú vo väčšine prípadov endogénny charakter, etiologické agens kolonizuje najčastejšie sliznicu dutiny ústnej. U nozokomiálnych mykóz je však významný i exogénny prenos rukami ošetrojúceho personálu. Medzi ďalšie, častejšie sa u nás vyskytujúce kvasinkovité mikroorganizmy patrí lipofilný druh *Malassezia furfur*, pôvodca ochorenia pityriasis versicolor. Hlavným príznakom sú hyper- alebo naopak hypopigmentované škvrny na povrchu kože, kryté jemnými šupinkami. Závažné systémové infekcie, hlavne pľúc a CNS, môže spôsobiť kvasinka *Cryptococcus neoformans* [15].

Z vlákнитých húb sú u nás najčastejšími pôvodcami povrchových mykotických infekcií dermatofyty, v prípade systémových aspergily. Medzo dermatofytov sa radia príslušníci troch rodov, *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Z nich bežne spôsobuje humánne mykózy okolo 10 druhov, najčastejšie *T. rubrum*. Niektoré dermatofyty sú antropofilné, adaptované na ľudský organizmus, iné zoofilné alebo geofilné, kedy sa infekcia na človeka prenáša zo zvierat (psov, mačiek), resp. z pôdy. Dermatofyty, vzhľadom k schopnosti utilizovať keratín, môžu vyvolať ochorenia kože a jej derivátov. Na koži sa najčastejšie prejavujú ako okrúhle, svetlo červené, ohraničené ložiská, často pokryté šupinami epidermis. U lézií spôsobených zoofilnými či geofilnými dermatofytmi je na okrajoch výrazná zápalová reakcia s tvorbou pľuzgierikov. Postihnutie vlasov sa môže prejavovať ako nenápadné, olupujúce sa ložiská, až po značne rozsiahle bezvlasé oblasti. Infekcia fúzov sa môže takisto vyskytovať v nenápadnej povrchovej forme, ale i v podobe abscesov uložených v podkoží. Onychomykóza sa objavuje na jednom, ale i viac nechtoch, najčastejšie začína žltým sfarbením jeho voľného okraja, platnička postupne stráca lesk a hrubne [12].

Spóry vlákнитých húb rodu *Aspergillus* sa bežne vyskytujú v ovzduší, preto sú najčastejšie infikované pľúca a paranazálne dutiny. Etiologicky dominuje druh *A. fumigatus*. Často fatálne končiacu pľúcnu infekciou, invazívnu aspergilózou (s formou bronchoinvazívnou, angioinvazívnou alebo nekrotizujúcou) vyvolávajú mikromicéry u pacientov s hematologickými chorobami a neutropéniou. Klinické príznaky nie sú špecifické a včasná diagnostika je obtiažna [16].



Obrázok 5: *Aspergillus fumigatus* [17]

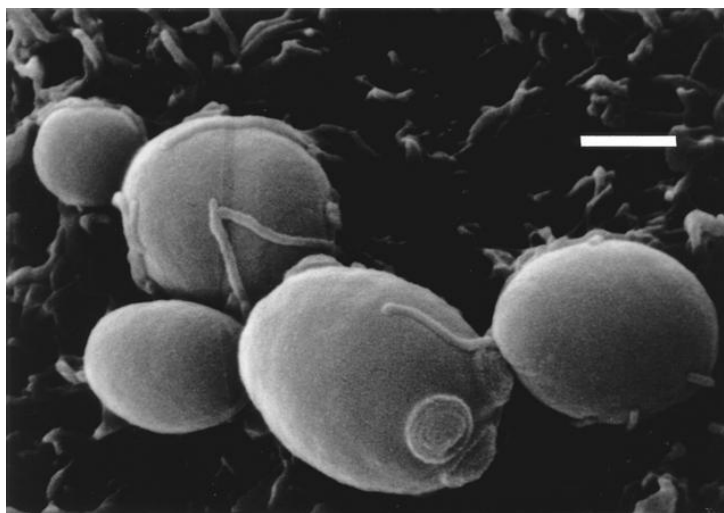


Naopak u hypersenzitívnej reakcie na aspergilové antigény, prítomné v prieduškách v súvislosti s astmou alebo cystickou fibrózou, sú podkladom alergickej bronchopulmonálnej aspergilózy. Choroba sa najčastejšie manifestuje epizodickými záchvatmi, kašľom a vykašliavaním menšieho množstva nahnedlého sputa. U imunokompetentných jedincov po prekonanej tuberkulóze alebo sarkoidóze môžu aspergily osídliť performované dutiny až pľúcne laloky. Pacientom obvykle nečinia subjektívne potiaže a býva preto odhalený až pri rentgenovom vyšetrení. Najčastejším prejavom rozšírenia aspergilovej infekcie krvou je aspergilóza mozgu s prejavami vnútrolebečnej hypertenzie alebo meningeálneho dráždenia a poruchami vedomia. Vzácné, ale často fatálne končiacie ochorenia, tzv. zygomykózy, sú spôsobené vláknitými hubami z čeľade *Mucoraceae*, hlavne príslušníkmi rodov *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor* a *Absidia*. Patogenéza infekcie je podobná aspergilovej, preto sú najčastejšie postihnuté pľúca a paranazálne dutiny s prípadnou inváziou do mozgového tkaniva [12].

Pravdepodobnosť záchytu importovaných endemických a tropických mykóz (napr. histoplazmózy, blastomykózy, kokcidiodomykózy, sporotrichózy) je v bežnej praxi veľmi nízka a podozrenie na ne vzniká predovšetkým na základe kvalitne odobratej anamnézy, zameranej na cestovateľské aktivity pacienta [18].

## 2.7 *Candida glabrata*

Rod *Candida* sa zaraďuje medzi kvasinkovité mikromycéty spolu s rodmi *Blastoschizomyces*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* a *Trichosporon*. Vsúčasnosti je známych viac ako 200 druhov zaraďovaných do rodu *Candida*. *Candida glabrata* je kvasinka rodu *Candida*, predtým známa ako *Torulopsis glabrata*. Bunky kandid sú z morfológického hľadiska prevažne guľaté, oválne alebo pretiahnuté a označujú sa ako blastokonídie. Ich veľkosť sa priemerne pohybuje medzi 3 – 5 µm. Väčšina druhov je fakultatívne anaeróbnych. Rastie pri 37 °C. Na agare tvorí prevažne hladké lesklé kolónie s krémovitou konzistenciou. Až do nedávnej doby bola považovaná za nepatogénny organizmus. Avšak so stále rastúcou populáciou jedincov s oslabenou imunitou trendy ukazujú, že *C. glabrata* je vysoko vyskytujúci sa patogén v urogenitálnom trakte. Je druhou najbežnejšou sa vyskytujúcou príčinou mukózných Candidových infekcií. Tvorí mikrobiálny film na močových katétroch a často spôsobuje problémy na zubných zariadeniach, ako napríklad protézach [19].



Obrázok 6: *Candida glabrata* [20]

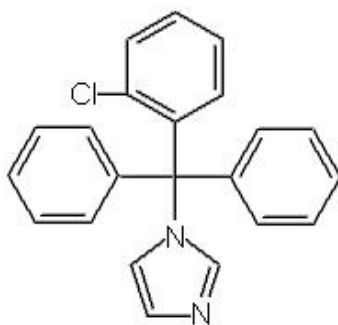


## 2.8 Syntetické liečivá pre liečbu mykóz

Najpočetnejšie je rastúpená skupina azolov, používaná celkovo i lokálne. Z hľadiska chemickej štruktúry sa rozlišujú vývojovo staršie imidazolové a novšie triazolové deriváty. Ich mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy ergosterolu, nevyhnutnej súčasti cytoplazmatickej membrány húb. Najstarší z nich je mikonazol, registrovaný už len v kombinácii s metronidazolom k terapii vaginálnych mykóz. V celkovej liečbe sa najčastejšie používa flukonazol, účinný hlavne na kandidy a kryptokoky, medzi lokálnymi antimykotikami má podobnú pozíciu klotrimazol. K novým širokospektrálnym triazolom patrí hlavne vorikonazol, pre liečbu invazívnej aspergilózy, a posakonazol, ktorý má významný účinok na pôvodcov zygomykóz. K ďalším syntetickým liečivám patria skupiny: polyény (amfotericín, nystatín, natamycín), echino-kandiny (kaspofungin, mikafungin), alylaminy (terbinafín), morfolíny (amorfolín), hydroxy-pyridóny a nenasýtené mastné kyseliny (kyselina undecylénová a jej deriváty) [12].

### 2.8.1 Klotrimazol

Klotrimazol (Obrázok 7) je moderné, širokospektrálne antimykotikum, patriace do skupiny imidazolových derivátov, ktoré inhibujú syntézu ergosterolu, základnú zložku bunkových membrán hubovitých mikroorganizmov. Oproti iným aktívnym látkam je klotrimazol rovnako účinný proti všetkým hubovitým mikroorganizmom (plesne, dermatofyty, kvasinky), ktoré sú schopné vyvolať infekciu kože človeka. Klotrimazol je vysoko účinný, pretože preniká do kože v dostatočnej koncentrácii. Nežiaduce účinky sa pri liečbe klotrimazolom neočakávajú, pretože účinná látka sa dostáva len veľmi obtiažne do krvného riečiska. Primárna alebo sekundárna rezistencia hubovitých mikroorganizmov proti klotrimazolu je nepravdepodobná. Navyše je klotrimazol účinný i proti rôznym baktériám, ktoré sa môžu podieľať na sekundárnej infekcii [21].



Obrázok 7: Štruktúra klotrimazolu

## 2.9 Antimykotický gel s obsahom nanočastíc

K trendom moderných antifungálnych krémov a gélov patrí kombinácia syntetických liečiv s nanočasticovými nosičovými systémami. Efektivita samotných liečiv je obmedzovaná bariérovou funkciou pokožky (hlavne *Stratum corneum*). Niozómy (neionické tenzidy) a lipozómy sú vezikulárne systémy pozostávajúce z amfifílnych molekúl a cholesterolu. Sú biokompatibilné a reaktívne s dobrou penetračnou aktivitou. Tieto systémy sú schopné enkapsulovať hydrofilné i hydrofóbne molekuly. Enkapsuláciou je predĺžená doba pôsobenia a metabolizmus liečiva. Príkladom tohto využitia je príprava niozómov s enkapsulovaným itraconazolom. Bola preukázaná lepšia penetrácia liečiva do kože po enkapsulácii. Niozómy boli schopné prekonať bariéru *Stratum corneum* a antifungálne pôsobiť. Sú preto sľubnými nosičmi kožných liečiv [22].

## **2.10 Prírodné extrakty s antitumorovým účinkom**

V práci sú použité vodné a lipidové extrakty z rastlín, ktorých účinky sú v krátkosti popísané v bodoch 2.10.3 až 2.10.14, pre prípravu funkcionalizovaných častíc a vlákien. Taktiež bola skúmaná antioxidačná aktivita, obsah polyfenolov a flavonoidov v týchto vzorkách.

### **2.10.1 Antioxidačná aktivita**

Oxidačný stres sa odráža v nerovnováhe medzi prítomnosťou reaktívnych foriem kyslíka a schopnosťou ľudského tela detoxikovať reaktívne intermediáty alebo opraviť nimi spôsobené poškodenie. Spôsobuje kardiovaskulárne choroby, starnutie, rakovinu alebo neurodegeneratívne ochorenia. Hladina reaktívnych foriem kyslíka (ROS), medzi ktoré patria voľné radikály aj neradikálové formy, prudko stúpa za patologických podmienok a spôsobuje oxidačný stres v biologických systémoch. Antioxidanty brzdia a predchádzajú oxidácii molekúl, ktoré produkujú voľné radikály, a navyše sú schopné ukončiť reťazové reakcie spôsobené voľnými radikálmi. Biologické systémy teda vyžadujú neustály príjem exogénnych antioxidantov, ktoré dopomáhajú kontrolovať hladinu ROS. Za najlepší zdroj prírodných antioxidantov sú považované fenolické látky, ktoré sa nachádzajú v rôznych rastlinných orgánoch (listy, korene), v ovocí a zelenine [23].

### **2.10.2 Polyfenoly a flavonoidy**

Prírodné polyfenolické látky tvoria štruktúrne veľmi rozmanitú skupinu prirodzene sa vyskytujúcich látok. V súčasnosti je známych viac ako 8000 druhov polyfenolických štruktúr, z toho viac ako 4000 druhov patrí do skupiny flavonoidov. Práve flavonoidy (flavány, flavanóny, flavóny, flavonoly, chalkóny, antocyanidíny) sú najviac študovanou skupinou polyfenolických zlúčenín, najmä pre ich blahodarný vplyv na obehový systém. Ďalej sem patria napríklad ligníny, proantocyanidíny, izoflavóny, katechíny, taníny atď. Niektoré prírodné polyfenoly napríklad majú štruktúru podobnú estrogénom a preto sa radia medzi tzv. fytoestrogény. Vzhľadom k ich širokému rozšíreniu a vysokej koncentrácii v rastlinách sú bežnou súčasťou ľudskej potravy. Hlavným zdrojom prírodných polyfenolov sú rôzne druhy ovocia a zeleniny, byliny, orechy, sója, obilniny, kakao, ale tiež zelený čaj, olivový olej, káva, pivo a červené víno. Červené hrozno, obzvlášť jeho šupka a jadierka, sú mimoriadne bohaté na biologicky aktívne flavonoidy. V samotných rastlinách majú polyfenoly rôzne biologické funkcie, napríklad dodávajú chuť a farbu, podieľajú sa na tvorbe štruktúry rastlín, na ochrane proti infekciám, UV-žiareniu, pred patogénmi a fyzikálnym poškodením. V živočíšnom organizme majú prírodné polyfenoly široké spektrum fyziologických a farmakologických účinkov [24].

### **2.10.3 Oregano**

Oregano (*Origanum vulgare*) je rastlina používaná v tradičnej čínskej medicíne pre liečbu návalov tepla, horúčky, zvracania, akútnej gastroenteritídy a respiračných chorôb. Esenciálny olej z oregana je používaný v mnohých medicínskych a zdravotných produktoch. Viac než 50 % oreganového oleja pozostáva z fenolických látok (najmä carvacrol a thymol). Taktiež obsahuje seskviterpény, flavonoidy a ďalšie látky. Boli pozorované biologické a farmaceutické vlastnosti esenciálneho oleja z oregana a bolo zistené antioxidačné, antibakteriálne, antifungálne, protirakovinové a protizápalové pôsobenie [25].

Taktiež bolo zistené, že esenciálny olej z oregana vykazoval antiproliferatívnu aktivitu na zapálených ľudských dermálnych fibroblastoch. Má taktiež vplyv na gény a signálne dráhy zahrnuté pri zápale, remodelácii tkanív a rakovinových signálnych procesoch [26].

Je teda možné skonštatovať, že oreganový esenciálny olej obsahujúci carvacrol ako hlavnú zložku je sľubným kandidátom pre použitie v produktoch starostlivosti o kožu a vykazuje protizápalové a protirakovinové vlastnosti [26].



Obrázok 8: Oregano [27]

#### 2.10.4 Peper

Peper (*Piper nigrum*) patrí do rodiny *Piperaceae* a jeho sušený plod je používaný bežne ako čierny peper, súčasť skoro každej kuchyne. Štúdie peporu dokázali prítomnosť rôznych minerálov, vitamínov ( $\beta$ -karotén, tokoferol, askorbová kyselina, tiamín, riboflavín a niacín), polysacharidov (arabinóza, ramnóza), starolov (terpenoidy, seskviterpény), mastných kyselín (linolová), prchavých olejov, alkaloidov (piperín, piperidín, kapsaicín), organických kyselín a rôznych fenolických látok (benzamidy, gallová kyselina, kumaríny). Piperidín vykazuje protizápalové, antikonvulzívne (proti kŕčom), hypoglykemické, antidepresívne, insekticídne, antioxidačné a protinádorové účinky. V nedávnej štúdii bolo dokázané, že látky izolované z peporu vykazovali larvicídny účinok proti komárovi *Aedes aegypti*, ktorý je prenášačom vírusu dengue [28].



Obrázok 9: Peper [29]

#### 2.10.5 Lapacho

Lapacho je predovšetkým známy ako legendami opradený čaj Inkov. Jedná sa o prírodný produkt z kôry stromu Lapacho (*Tecoma lapacho*). Vnútrošná kôra červenej farby sa získava z odrôd Lapacho Colorado a Lapacho Morado. Lapacho je od pradávna používané vo fylo medicíne pre liečbu najrôznejších zdravotných problémov, ako napríklad bakteriálne a fungálne infekcie, horúčka, syfilis, malária, alebo ochorenia močového mechúra a tráviaceho traktu.  $\beta$ -lapachón ( $\beta$ -LAPA), prírodný produkt zo stromu lapacho v Južnej Amerike, je potenciálne chemoterapeutické činidlo, ktoré vykazuje široký rozsah farmakologických efektov, ako sú antivirotické, antiparazitické, protirakovinové a protizápalové efekty [30].



Obrázok 10: Lapacho [31]

#### 2.10.6 Kapucínka

Kapucínka (*Tropaeolum majus*) sa už od 17. storočia používala v herbálnej medicíne. Fytochemické štúdie preukázali prítomnosť zlúčenín síry (glukotropaeolín), flavonoidov, antikyanínov, karotenoidov, fenolových kyselín a vitamínu C v tejto rastline. Je používaná k liečbe horných dýchacích ciest (zápal mandlí, priedušiek) a chorôb močových ciest. Taktiež je používaná v dermatológii a kozmetike pre liečbu ochorení kože, nechťov a vlasov (lupiny), popálenín a podráždení kože. Vykazuje antimikrobiálnu aktivitu, ktorá je vysvetlená prítomnosťou benzyl izotiokyanátu a má taktiež antioxidačné účinky [32].



Obrázok 11: Kapucínka [33]

#### 2.10.7 Pomarančová kôra

Extrakty z pomarančovej kôry obsahujú veľké množstvo flavonoidov, fenolových kyselín a ich derivátov. Citrusivé flavonoidy vykazujú rôzne bioaktívne pôsobenia, vrátane antioxidačného, protizápalového, protirakovinového a pôsobia taktiež proti arteoskleróze. Je zdrojom draslíka, riboflavínu a vitamínu A [34].



Obrázok 12: Pomarančová kôra [35]

### 2.10.8 Dubová kôra

Dubová kôra je od pradávna používaná na prípravu kúpeľov pri liečbe kožných ochorení, ekzému, popálenín, hemoroidov a gynekologických problémov alebo liečbe rán. Vďaka obsahu tanínov má antimikrobiálne a protizápalové účinky. Dubová kôra a jej vodné a alkoholické extrakty sa používajú taktiež na liečbu varixov a zápalov mukózných membrán. Účinné látky kôry pôsobia dezinfekčne. Dubová kôra má sťahujúci účinok, cievy sa zužujú. Vďaka tomu rýchlo ustupujú zápaly. Okrem uvoľnenia hrtana môžete dubovou kôrou liečiť a krvácanie dŕasien a bolesti hrdla. V surovom stave sa prikladá na zle sa hojace rany a tiež proti poteniu [36].



Obrázok 13: Dubová kôra [37]

### 2.10.9 Muškátový oriešok

Muškatový oriešok je sušené jadro semena rastliny *Mystica fragrans*. Je používaný v alternatívnej medicíne a vykazuje afrodiziakálne, protirakovinové, protizápalové účinky a taktiež napomáha s črevnými problémami a zlepšuje pamäť. Vďaka obsahu vitamínov, karotenoidov, terpenoidov, alkaloidov, flavonoidov, lignanov a fenolických látok má taktiež antioxidačné a antimikrobiálne účinky [38].



Obrázok 14: Muškátový orech [39]



#### 2.10.10 Kozinec blanitý

Koreň z rastliny *Astragalus membranaceus* je veľmi populárny v starostlivosti o zdravie. Používa sa pri liečbe nachladenia, hnačky, únavy, anorexie a chorôb srdca. V tomto koreni je obsiahnutých viac než 100 aktívnych látok, vrátane flavonoidov, polysacharidov, saponínov, aminokyselín a ostatných stopových prvkov. Literatúra informuje o tom, že polysacharidy predstavujú hlavné bioaktívne látky a majú mnoho účinkov, medzi ktorými sú účinky protirakovinové, antioxidačné, hyperglykemické. Ďalej sú tieto polysacharidy schopné znižovať krvný tlak a posilňovať imunitu. Hlavným reprezentantom je Astragalozyd IV [40].



Obrázok 15: Kozinec blanitý, koreň [41]

#### 2.10.11 Klinček

Klinček, získavaný z rastliny *Eugenia aromaticum*, je dôležité aromaticé koreníe. Používa sa vo farmaceutickom priemysle, hlavne v medicínskych prípravkoch na zuby a ďasná. Niekoľko štúdií dokázalo, že klinčekový olej má vysokú antimikrobiálnu aktivitu voči ľudským patogénnym mikroorganizmom a mikroorganizmom, ktoré spôsobujú kazeníe jedla. Hlavnou antimikrobiálnou zložkou v klinčeku je fenolická látka eugenol [42].



Obrázok 16: Klinček [43]

#### 2.10.12 Škorica

Škorica je koreníe, ktoré je využívané v medicíne pri poruchách krvného tlaku, nádorových ochoreniach, diabete, Alzheimerovej či Parkinsonovej chorobe. Výživové zloženie odhaľuje prítomnosť vitamínov a minerálov a hlavnými bioaktívnymi zložkami sú polyfenoly, cinnamaldehyd a eugenol. Škorica vykazuje antimikrobiálne, antioxidačné, protirakovinové a protizápalové účinky. Môže byť aplikovaná do takzvaných aktívnych obalov jedál s antimikrobiálnym účinkom, a taktiež vo farmaceutickom priemysle do liečivých prípravkov a v kozmetickom priemysle ako aromatické činidlo [44].



Obrázok 17: Škorica [45]

### 2.10.13 Zázvor

Zázvorový koreň (*Zingiber officinale*) vykazuje mnohé priaznivé účinky, ktoré sú využívané v tradičnej čínskej medicíne. Je používaný na liečbu črevných problémov, závraty, astmu alebo respiračné choroby. K ďalším priaznivým účinkom na ľudské telo patria antioxidačný, protizápalový, protirakovinový, hypoglykemický alebo hypolipidemický účinok. Boli študované protirakovinové účinky 6-gingerolu a 6-shogaolu na ľudských rakovinových bunkách. Tieto látky boli efektívne pri nádoroch vaječníkov, pľúc, pečene, kože a konečníka. U 6-gingerolu bol zaznamenaný protinádorový účinok taktiež u rakovinových buniek žalúdka a pankreasu. Extrakty zo zázvorového koreňa sú komerčne produkované ako potravinový doplnok a farmaceutické prípravky [46].



Obrázok 18: Zázvor [47]

### 2.10.14 Badyán

Badyán (*Illicium verum*) je dôležitou súčasťou čínskej medicíny a taktiež bežne používané korenie. Vykazuje antifungálnu aktivitu hlavne voči mykotoxigénnym hubám. Je považovaný za dobrý zdroj prírodných látok so značnou antioxidačnou a antimikrobiálnou aktivitou. Antifungálna aktivita je spôsobená obsahom trans-anetolu, ktorý je hlavnou zložkou badyánového oleja. Ten môže byť využitý v rôznych odvetviach, ako napríklad v kozmetike, farmácii. Mohol by taktiež nahradiť syntetické antioxidanty, ktoré spôsobujú negatívne účinky na ľudské zdravie [48].



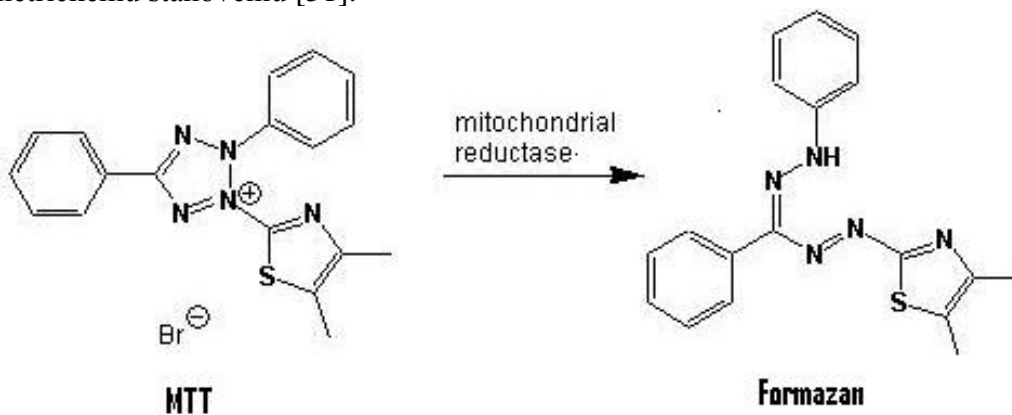
Obrázok 19: Badyán [49]

## 2.11 Keratinocyty

Koža je tvorená dvomi hlavnými vrstvami- vnútornou dermis a vonkajšou epidermis. Dermis je tvorená fibroblastmi a extracelulárnou matrix a je bohato popretkávaná kapilármi a nervovými zakončeniami. Epidermis je tvorený prevažne keratinocytmi, ďalej melanocytmi, Langerhansovými ostrovčekmi a Merkelovými bunkami. Výsledkom procesu zvaného keratinizácia je tvorba kožnej bariéry. Bariéroová funkcia kože je daná najvrchnejšou vrstvou epidermis zvanou stratum corneum, ktorá je tvorená korneocytmi (čiže keratinocytmi, ktoré sú v konečnej fáze diferenciácie) a lipidickou matrix. Migrácia a proliferácia keratinocytov je dôležitá pre reepitelizáciu poranených miest. Keratinocyty taktiež zlepšujú zápalový proces produkciou protizápalových cytokínov, čo vedie k hromadeniu leukocytov [50].

### 2.11.1 MTT test

MTT test je kolorimetrické stanovenie bunkovej aktivity. MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5- difenyltetrazolium bromid) je mitochondriálnou NADH oxidoreduktázou redukované na fialový formazán. Rýchlosť tvorby formazánu odpovedá aktivite dýchacieho reťazca a odráža tak metabolickú aktivitu bunky. Žlté MTT sa mitochondriálnymi enzýmami dýchacieho reťazca redukuje na fialový formazánový derivát (Obrázok 20), ktorý zostáva vo vnútri buniek vo forme nerozpustných granúl. Po pridaní detergentu (lauroylsírnan sodný, SDS) a okyslení sa farbivo z buniek uvoľní a rozpustí, takže vznikne číry roztok vhodný k fotometrickému stanoveniu [51].



Obrázok 20: MTT test [52]



## **2.12 Charakterizácia častíc**

### **2.12.1 DLS**

Dynamický rozptyl svetla je metóda vhodná pre meranie veľkosti častíc v submikrónovej oblasti. Základom tejto neinvazívnej techniky je meranie fluktuácie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja okolo jej priemernej hodnoty. Tieto fluktuácie súvisia s interferenčným zoslabovaním a zosilňovaním svetla rozptýleného na nestacionárnych časticiach disperznej fáze, podliehajúcich Brownovmu pohybu. Čím rýchlejšie sa častice pohybujú, tým rýchlejšie sa intenzita rozptýleného svetla mení. Rýchlosť týchto zmien je priamo závislá na pohybe molekuly [53].

### **2.12.2 Zeta potenciál**

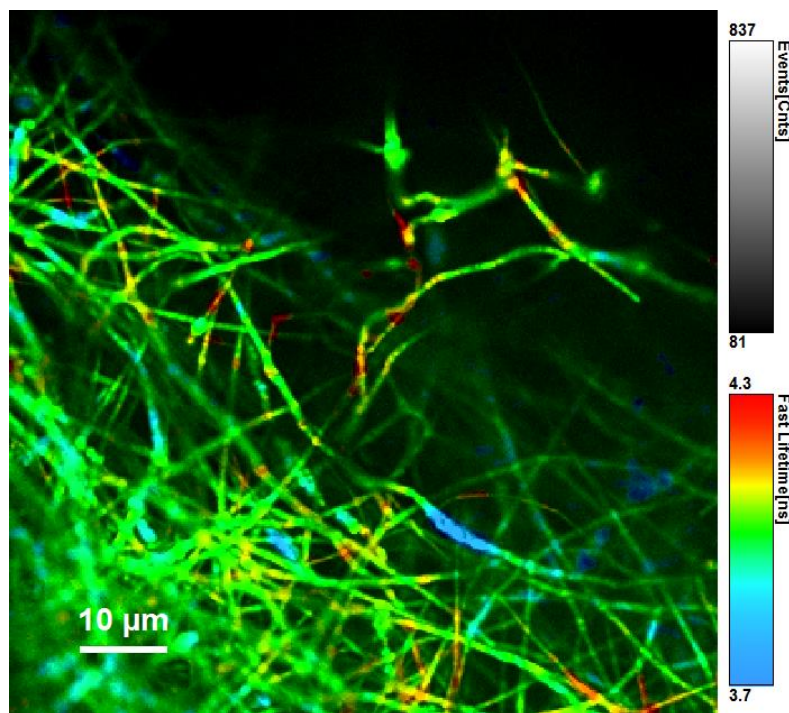
Pre elektricky nabitú suspenziu sa dá princíp rovnováhy sily popísať teóriou, ktorá navrhuje, že energetická bariéra vyplývajúca z odpudzivej sily zabráni, aby sa dve častice navzájom k sebe priblížili a držali pohromade, pokiaľ tieto častice nemajú dostatočnú tepelnú energiu pre prekonanie tejto bariéry. Veľkosť tejto potenciálovej bariéry je možné vyjadriť pomocou zeta potenciálu, čo je potenciál sklzu medzi časticou a združenou dvojvrstvou s obklopujúcim rozpúšťadlom. Ak majú všetky častice v suspenzii vysoký negatívny alebo pozitívny potenciál zeta, potom budú inklinovať k odpudzovaniu sa navzájom a častice nebudú mať žiadnu tendenciu sa zhlukovať. Ak budú mať častice nízke hodnoty zeta potenciálu, potom odpudzovanie nebude dostatočné k tomu, aby sa zabránilo zhlukovaniu častíc. Všeobecná čiara medzi stabilnou a nestabilnou suspenziou sa berie ako +30 mV alebo - 30 mV a častice, ktoré majú zeta potenciál mimo tieto medze, sa považujú za stabilné [54].

## **2.13 Charakterizácia vlákien**

### **2.13.1 FLIM**

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) je mikroskopická metóda zobrazujúca dobu života fluorescencie. Táto metóda je nezávislá na koncentrácii fluoroforu, intenzite excitácie a ďalších faktoroch limitujúcich meranie. Každý fluorofor je okrem emisného spektra charakterizovaný i životnosťou fluorescencie, ktorá je definovaná ako priemerný čas, počas ktorého molekula ostáva v excitovanom stave pred návratom do základného stavu za emitácie fotónu. FLIM závisí na intenzite ustáleného stavu. Metódy pre meranie životnosti fluorescencie je možné rozdeliť na frekvenčné a časové (pulzné). Kombináciu analýzy životnosti so zobrazovaním pri FLIM je možné využiť k štúdiu priestorovo rozlíšených signálov (napríklad topológia vzorku), či k získaniu dodatkových informácií (rozpoznávanie molekúl, heterogenita nanoprostredia, väzby molekúl) [55].

Produkuje obraz založený na rozdieloch doby zotrvania fluorescenšnej vzorky v excitovanom stave. Keďže nezávisí na koncentrácii a absorpcii vzorky, hrúbke vzorky, svetlom zapríčinenom odfarbovaní alebo intenzite excitácie, je viac robustná ako metódy založené na intenzite. Doba fluorescencie závisí na mnohých podmienkach v prostredí, ako je napríklad pH, iónová koncentrácia, koncentrácia kyslíku, molekulárne väzby alebo blízkosť akceptorov energie. Pri použití fluorescenčných sond citlivých na prostredie, v ktorom sa nachádzajú (vplyv solvazácie rozpúšťadlom, prítomnosť iónov a iné) je možné vo vzorku rozlíšiť oblasti s odlišnými vlastnosťami na základe toho, ako sa mení doba života fluoroforu. To robí techniku FLIM vhodnou k stanoveniu rôznych druhov funkčných vzoriek [56].



Obrázok 21: PHB vlákna ofarbené NR

### 2.13.2 FTIR ATR

Infračervená spektroskopia je analytická technika určená predovšetkým pre identifikáciu a štruktúrnú charakterizáciu látok. Táto technika meria pohltie infračerveného žiarenia (elektromagnetické žiarenie s  $\lambda = 780 \text{ nm}$  až  $1 \text{ mm}$  čo odpovedá vlnočtu  $12500$  až  $20 \text{ cm}^{-1}$ ) analyzovaným materiálom. Pri tejto absorpcii dochádza k zmenám rotačne vibračných energetických stavov molekuly v závislosti na zmenách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupom je infračervené spektrum, ktoré je grafickým znázornením funkčnej závislosti energie vyjadrenej v percentách transmitance (T) alebo jednotkách absorbie (A) na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia [57].

Technika zoslabeného úplného odrazu (ATR - Attenuated Total Reflection) je založená na princípe jednoduchého či viacnásobného úplného odrazu žiarenia na fázovom rozhraní meraného vzorku a meriaceho kryštálu s dostatočne vysokým indexom lomu. Kryštál je väčšinou planárny, v tvare lichobežníkového hranolu, prevážne umiestnený v horizontálnom usporiadaní. Naňho sa nanáša vzorka. Zväzok lúčov je privedený do kryštálu sústavou zrkadiel tak, aby uhol dopadu na fázové rozhranie vyhovel podmienke úplného odrazu. Keď meraná vzorka absorbuje žiarenie o určitej frekvencii, potom bude táto zložka v totálne odrazenom žiarení zoslabená. Penetračná hĺbka žiarenia do povrchu vzorky je rádovo v jednotkách  $\mu\text{m}$ , charakterizujeme len veľmi tenké povrchové vrstvy materiálu, avšak vzhľadom k možnosti viacnásobného odrazu na fázovom rozhraní získame veľmi kvalitné spektrum. Medzi hlavné výhody ATR techniky patria:

- minimálna príprava vzoriek – stačí umiestniť na kryštál a zbierať data,
- rýchle a jednoduché čistenie – očistenie povrchu kryštálu,
- analýza vzoriek v ich prirodzenom stave – nieje potrebné ohrievanie, stláčanie do tabliet,
- výborná pre analýzu silno absorbujúcich vzoriek – penetračná hĺbka v radoch  $\mu\text{m}$  [58].

### 3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je príprava častíc a vlákien z vybraných prírodných biopolymérov, funkcionizácia pripravených častíc a vlákien antimikrobiálnymi látkami a charakterizácia účinku častíc a vlákien na kvasinku *Candida glabrata* a humánne bunky. Súčasťou práce je riešenie nasledujúcich čiastkových úloh:

- Príprava a charakterizácia vybraných rastlinných extraktov.
- Príprava a charakterizácia viacerých typov častíc s obsahom aktívnych antimykotických látok.
- Optimalizácia prípravy PHB vlákien, príprava a charakteristika PHB vlákien obsahujúcich vybrané antimykotické látky.
- Štúdium antimykotickej aktivity extraktov, častíc a vlákien na kultúre *Candida glabrata*.
- Štúdium cytotoxicity vybraných častíc a vlákien na humánnych epidermálnych keratinocytoch.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité mikroorganizmy

V tejto práci bola použitá kultúra *Candida glabrata* CCM 8270, ktorá pochádza z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

### 4.2 Použité humánne bunky

Pre stanovenie cytotoxicity boli použité bunky HEK (102-105a) Cryopreserved Epidermal Keratinocytes; adult; z firmy Culture Collections, Public Health England.

### 4.3 Použité štandardné chemikálie

- Klotrimazol- Sigma-Aldrich (SRN)

#### 4.3.1 Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovenie

- Folin- Ciocalteu činidlo- p.a., LachNer, (ČR)
- Uhličitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Kyselina gallová- Sigma-Aldrich (SRN)
- Dusičnan sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Chlorid hlinitý- p.a., LachNer, (ČR)
- Hydroxid sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Katechin- Sigma-Aldrich (SRN)
- Etanol- p.a., LachNer, (ČR)

#### 4.3.2 Chemikálie použité na prípravu častíc a vlákien

- Lecithin, Sigma-Aldrich (SRN)
- Cholesterol- Sigma-Aldrich (SRN)
- Polyhydroxybutyrát- Biomer (SRN)
- Tetraethylamonium bromide- Sigma Aldrich (UK)
- Nílska červen pre mikroskopiu- Sigma-Aldrich (SRN)

#### 4.3.3 Chemikálie použité na kultiváciu *Candida glabrata*

- D-glukóza bezvodá- p.a., LachNer, (ČR)
- Pepton aus Casein- Roth (SRN)
- Agar- Himedia (India)
- Kvasničný autolyzát- Himedia (India)

#### 4.3.4 Chemikálie použité na kultiváciu keratinocytov a MTT testy

- Médium KGM Gold Single Quods - Lonza, (SWI)
- Dodecylsírán sodný, Serva (SRN)
- MTT- Duchefa Biochemie (NL)
- trypsin- Versene EDTA, P-Lab (CZ)
- FBS fetálne bovinné sérum- HyClone (USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (ČR)
- Antibiotic-Antomycotic 100X(Biosera), Biotech (SRN)

#### **4.3.5 Chemikálie použité na stanovenie antioxidačnej aktivity**

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid)diammonium salt) - Sigma-Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný- Sigma-Aldrich (SRN)
- Etanol- p.a., LachNer, (ČR)
- Trolox- Sigma-Aldrich (SRN)

#### **4.3.6 Další použitý materiál**

- Micelárna voda MIXA

#### **4.4 Prístroje a pomôcky**

- CellCulture CO<sub>2</sub> Inkubátor, ESCO (SRN)
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)
- Koloidný DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
- ELISA Reader BioTek ELx808 (USA)
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandeline (SRN)
- Biohazard box, model Airstream, třída II - ESCO, Biotech (SRN)
- Temperovaná trepačka Heidolph Promax 1020, Labicom (ČR)
- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Vortex, Vitrum, Heidolph Reax top (SRN)
- Centrifúga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (SRN)
- Optický mikroskop a software Dino Capture (ČR)
- Rotačná vákuová odparka RV –ML, IKA Werke (SRN)
- Vodná lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)
- Rotačný zvlákňovací prístroj
- Pumpa New Era Pump Systems model NE-300, SpringePump (USA)
- Zebtron ZB-WAX-Plus kapilární GC kolona 30m x 0.32mm x 0.50µm-
- TRACE GC/FID - ThermoQuest S.p.A (Taliansko)
- Časovo rozlíšený laserový skenovací konfokálny mikroskop MicroTime 200, PicoQuant (SRN) s hlavami s pikosekundovými laserovými diódami a vyhodnocovacím systémom SymPhoTime
- FTIR-ATR spektrometr Nicolet iS 50 FT-IR

#### **4.5 Příprava extraktov**

##### **4.5.1 Vodné extrakty**

Do kadičky bolo navážené potrebné množstvo vzorky (0,1 g pre charakterizáciu extraktov) a bolo pridané 10 ml vriacej destilovanej vody. Po 15 minútach bol extrakt scedený cez gázu.

##### **4.5.2 Lipidové extrakty – extrakcia podľa Folcha**

Ako extrakčná zmes bol použitý chloroform a metanol v pomere 2:1. Vzorka bola najprv homogenizovaná a potom bol 1 g miešaný s 20 ml extrakčnej zmesi pri laboratórnej teplote po dobu 60 minút. Extrakt bol prefiltrovaný. Vzorka z filtru bola prevedená do kadičky a zmiešaná s ďalšími 10 ml extrakčnej zmesi a miešaná po dobu 30 minút. Exktrakty z oboch krokov boli zmiešané s 36 ml destilovanej vody. Takto pripravená zmes bola centrifugovaná 5 minút (1000 rpm).

Chloroformová vrstva bola zbavená zbytkovej vody bezvodým síranom sodným a následne odparená na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C. Vyextrahované lipidy boli v chloroforme v nádobách z tmavého skla uchovávané v chladničke pri 4 °C.

#### **4.6 Stanovenie antioxidačnej aktivity extraktov**

ABTS bol rozpustený v destilovanej vode na koncentráciu  $c = 7$  mmol/l. Radikálový anión  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  bol získaný reakciou s 2,45 mmol/l peroxodisíranom draselným. Roztok bol najmenej 12 hodín ponechaný v tme pri izbovej teplote. Pred použitím bol  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  zriedený etanolom na absorbanciu približne  $A = 0,700$  pri  $\lambda = 734$  nm oproti etanolu.

Do zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , bolo pridaných 10  $\mu\text{l}$  extraktu a bol zaznamenaný pokles absorbancie v 10. minúte. Blank sa pozostával z 1 ml  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  a 10  $\mu\text{l}$  destilovanej vody. Pre kalibráciu bol pripravený roztok Troloxu v koncentračnom rozmedzí 50 – 400  $\mu\text{g/ml}$ . Konečná koncentrácia bola vypočítaná pomocou rovnice regresie kalibračnej priamky  $y = 0,00138912 x$  [ $\mu\text{g/ml}$ ].

#### **4.7 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie polyfenolov**

K 1 ml Folin- Ciocalteauovho činidla zriedeného vodou v pomere 1:9 bol pridaný 1 ml vody a 50  $\mu\text{l}$  vzorky. Roztok bol premiešaný pomocou Vortexu a po 5 minútach bolo pridané 1,5 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Po premiešaní a 15 minútovom stáťi bola meraná absorbancia pri 750 nm. Ako kalibračný roztok bola použitá kyselina gallová v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 0,7 mg/ml.

#### **4.8 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie flavonoidov**

Do skúmavky s 0,5 ml stanovovanej vzorky bolo pridané 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku  $\text{NaNO}_2$ . Obsah bol premiešaný a nechal sa 5 minút stáť. Potom bolo pridané 0,2 ml 10% roztoku  $\text{AlCl}_3$ , premiešané a ponechané 5 minút stáť. Bolo pridané 1,5 ml roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentrácii 1 mol/l a 1 ml destilovanej vody, po premiešaní bolo ponechané 15 minút stáť a bola meraná absorbancia pri 510 nm oproti destilovanej vode. Pre kalibráciu bol pripravený roztok katechínu v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 0,3 mg/ml. Katechín bol rozpúšťaný v etanole.

#### **4.9 Charakterizácia vybraných extraktov pomocou GC/FID**

##### **4.9.1 Transesterifikácia lipidov**

Do sklenenej vialky bolo napipetované 4,5 ml hexánu a pridané 500  $\mu\text{l}$  vzorku obsahujúceho extrahované lipidy. Zmes bola doplnená 500  $\mu\text{l}$  2M roztoku  $\text{KOH}$  v metanole a intenzívne pretrepávaná 8 minút. Potom bola zmes ponechaná 6 minút stáť, než došlo k rozdeleniu jednotlivých fáz. Pre analýzu metylesterov mastných kyselín plynovou chromatografiou bol odobraný 1 ml hornej fáze hexánu.

##### **4.9.2 Analýza GC/FID**

Pre analýzu metylesterov mastných kyselín bol použitý plynový chromatograf TRACE GC s automatickým dávkovačom bez deliča toku. Detekcia analytov bola prevedená plameňovo ionizačným detektorom. Chromatografická analýza prebiehala za nasledujúcich podmienok:

- Zebon ZB-WAX-Plus kapilárna GC kolóna 30m x 0.32mm x 0.50 $\mu\text{m}$ .
- Dávkovanie autosamplérom bez deliča toku, objem vzorku 1  $\mu\text{l}$ .
- Teplota injektora 250 °C.
- Nosný plyn dusík s prietokom 0,5 ml/min.

- Teplotný program: 60 °C, 5 min, vzostupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdržou 10 min, vzostupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdržou 15 min, vzostupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdržou 10 min.
- Plameňovo ionizačný detektor (FID), 250 °C, prietok vodíku 35 ml/min, prietok vzduchu 350 ml/min, make-up dusíku 30 ml/min.
- Celková doba analýzy: 50 minút.

Výsledné chromatogramy boli porovnané s kalibračnou radou mastných kyselín a bola zisťovaná prítomnosť mastných kyselín v jednotlivých vzorkách.

## **4.10 Príprava lipozómov**

### **4.10.1 Príprava lipozómov z vodných extraktov**

Pre každý typ lipozómov bolo navážené 20 mg cholesterolu a 180 mg lecitínu. Bolo pridaných 10 ml vodného extraktu smes byly ultrazvukovaná po dobu jednej minúty s intenzitou 80 %.

### **4.10.2 Príprava lipozómov z lipidových extraktov**

Navážený lipidový extrakt, 160 mg lecitínu a 20 mg cholesterolu boli pridané k 1 ml chloroformu. pripravený roztok bol spoločne s 10 ml destilovanej vody ultrazvukovaný po dobu 1 minúty intenzitou 80 %. Zbytkový chloroform bol odparený pomocou magnetickej miešačky s ohrevom pri teplote 55°C. V prípade kombinovaných častíc bola voda nahradená zvoleným vodným extraktom. V prípade prídavku PHB do lipozomových častíc bola časť lecitínu nahradená týmto materiálom.

## **4.11 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov**

Vzorky boli centrifugované (11000 ot./min; 60 minút). Enkapsulačná účinnosť (%) bola vyhodnotená pomocou stanovenia voľných polyfenolov v supernatante. Enkapsulačná účinnosť bola vypočítaná ako podiel enkapsulovanej zložky k celkovému množstvu zložky v pôvodnom roztoku.

## **4.12 Stanovenie veľkosti častíc pomocou DLS**

Roztoky častíc boli zriedené 100-krát destilovanou vodou. Do kyvety bol napipetovaný 1 ml zriedených roztokov častíc. Kyveta bola umiestnená do DLS prístroja Malvern Zetasizer ZS a bola meraná distribúcia a priemerná hodnota veľkosti častíc.

## **4.13 Stanovenie stability častíc pomocou zeta potenciálu**

Roztoky častíc boli zriedené 100-krát destilovanou vodou. Do kyvety bol umiestnený 1 ml zriedených roztokov častíc a bol vložený elektródový nástavec. Kyveta bola umiestnená do DLS prístroja Malvern Zetasizer ZS a bol meraný zeta potenciál. Stabilita častíc bola odvodená z hodnoty zeta potenciálu. Častice sa pokladajú za stabilné, ak je hodnota zeta potenciálu mimo interval -30 až 30 mV.

## **4.14 Štúdium krátkodobej stability častíc**

Štúdium krátkodobej stability častíc bolo stanovené pomocou uvoľňovania polyfenolov v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minút do etanolu. 1 ml častíc bol centrifugovaný po dobu 1 hodiny (11000 rpm). Usadené častice boli rozsuspendované do etanolu pomocou Vortexu. Po uplynutí potrebného času (0, 2, 5, 10, 20, 30, 60 minút) boli sцентрифugované a uvoľnené polyfenoly boli stanovené podľa postupu opísaného v bode 4.7.

#### **4.15 Štúdium dlhodobej stability častíc**

Pre štúdium dlhodobej stability častíc boli častice uchovávané vo vodnom prostredí pri teplote 4 °C. Dlhodobá stabilita bola vypočítaná na základe uvoľňovania polyfenolov v čase 0 a mesiac od prípravy častíc. Ďalej bola meraná dlhodobá koloidná stabilita častíc v roztoku prostredníctvom zeta potenciálu.

#### **4.16 Príprava PHB vlákien**

##### **4.16.1 Pomocou rotačného zvlákňovacieho prístroja**

Chloroformové roztoky PHB boli prikľapávané do stredu rotora. Vzniknuté vlákna boli zachytávané na tyčiach a zozbierané do sterilnej Petriho misky. V prípade vlákien s prídavkom klotrimazolu bol do roztoku PHB pridaný klotrimazol.

##### **4.16.2 Pomocou elektrospinningu**

Striekačka s chloroformovým roztokom PHB bola umiestnená do pumpy. Ku koncu striekačky a na kolektor boli pripevnené elektródy zdroja vysokého napätia. Vzdialenosť medzi koncom striekačky a kolektorom bola 15 cm. Pumpa bola nastavená na prietok 25 ml/hod a bol spustený zdroj vysokého napätia (15 kV). V prípade vlákien obsahujúcich lipidové extrakty bol do roztoku PHB pridaný príslušný lipidový extrakt.

#### **4.17 Antioxidačná aktivita vlákien**

Z vlákien pripravených pomocou elektrospinningu bol vystrihnutý 1 cm<sup>2</sup>. Do mikroskúmvky typu Eppendorf bolo napipetované 2 ml roztoku ABTS<sup>•</sup>, do ktorého bol ponorený štvorec vlákna. Po 10 minútach bol sledovaný pokles absorbancie podľa návodu opísanom v bode 4.6.

#### **4.18 Štúdium krátkodobej stability vlákien**

Krátkodobá stabilita vlákien bola skúmaná v troch prostrediach: voda, etanol a Mixa micelárna voda s pH = 5,5 (pH pokožky). Bolo skúmané uvoľňovanie polyfenolov z 1 cm<sup>2</sup> vlákien vytvorených pomocou elektrospinningu obsahujúcich lipidové extrakty škorice, klinčeku, oregana a dubovej kôry do 2 ml modelového prostredia. Polyfenoly boli stanovované v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minút podľa postupu popísanom v bode 4.7.

Ďalej bolo merané absorpčné spektrum každého vlákna naloženého 24 hodín v etanole, vode a Mixe micelárnej vode. Boli odčítané absorpčné maximá a v nich bolo sledované uvoľňovanie aktívnych látok v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minút. Pomocou micelárnej vody bola simulovaná pokožka s pH 5,5. Voda bola zvolená pre sledovanie uvoľňovania hydrofilných a etanol pre uvoľňovanie hydrofóbných aktívnych látok.

#### **4.19 Štúdium dlhodobej stability vlákien**

Vlákna pripravené pomocou elektrospinningu boli uchovávané v Petriho miskách po dobu 2 mesiacov pri laboratórnej teplote a následne bola stanovená antioxidačná aktivita a porovnaná s čerstvo pripravenými vláknami.

#### **4.20 Štúdium vlákien pomocou fluorescenčnej mikroskopie technikou FLIM**

Vlákna v suchom stave boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom (LSCM) MicroTime 200 pri excitácii 467 nm.



#### 4.21 Charakterizácia vlákien pomocou FTIR-ATR

PHB vlákna obsahujúce lipidové extrakty a klotrimazol boli podrobené FTIR-ATR analýze za nasledujúcich podmienok:

- jednodrazový diamantový ATR nástavec,
- background: vzduch,
- meranie: rozlíšenie 8, priemer 64 skenov.

#### 4.22 Kultivácia *Candida glabrata*

*Candida glabrata* bola kultivovaná v tekutých médiách v Erlenmayerových bankách aj na pevných médiách na Petriho miskách. Kultivácia prebiehala za stáleho trepania v trepačke vytemperovanej na teplotu 37°C. Inokulum kultúry *Candida glabrata* bolo zaočkované z Petriho misky do 50 ml tekutého sterilného média v 100 ml Erlenmayerovej banke. Z takto pripraveného inokula boli po 24 hodinách zaočkované Petriho misky a ďalšie tekuté médiá podľa potreby.

##### 4.22.1 Živné média

Pre kultiváciu kvasinkovej kultúry *Candida glabrata* bolo použité YPD médium, ktorého zloženie je uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1):

Tabuľka 1: Zloženie média

zložka	množstvo (g/l H <sub>2</sub> O)
kvasničný autolyzát	10
pepton	20
glukóza	20
agar	20

V prípade tekutého média bol vynechaný prídavok agaru. Sterilizácia médií prebiehala v tlakovom hrnci po dobu 1 hodiny.

#### 4.23 Antimykotické testy

##### 4.23.1 Skúmovkový test

Do sady skúmaviek bolo sterilne napipetované 5 ml média a 100 µl inokula. Boli pridané vlákna obsahujúce antimikrobiálnu zložku. Skúmavky boli umiestnené na trepačku s výhrevom, kultivácia prebiehala pri 37 °C po dobu 48 hodín. Pomocou merania zákalu pri 630 nm bol sledovaný inhibičný účinok vlákien v čase 6, 24 a 48 hodín. Ako blank boli použité vlákna PHB, ktoré neobsahovali antimikrobiálnu zložku.

##### 4.23.2 Agarový difuzný test

###### 4.23.2.1 Jamkový

Na Petriho misky obsahujúce pevné médium bolo rovnomerne nanosených 100 µl inokula. Pomocou špičky pipety boli vytvorené do média jamky. Do jamiek bolo napipetované 50 µl skúmaného vzorku. Takto pripravené Petriho misky boli umiestnené na trepačku s výhrevom a kultivácia prebiehala po dobu 24 hodín pri teplote 37°C. Potom bola odčítaná veľkosť inhibičných zón.

#### 4.23.2.2 Diskový

Na Petriho misky obsahujúce pevné médium bolo rovnomerne nanesených 100  $\mu$ l inokula. Na povrch bola nanesená vzorka lipidového extraktu a takto pripravené Petriho misky boli umiestnené do trepačky s výhrevom a kultivácia prebiehala po dobu 24 hodín pri teplote 37°C. Potom bola odčítaná veľkosť inhibičných zón.

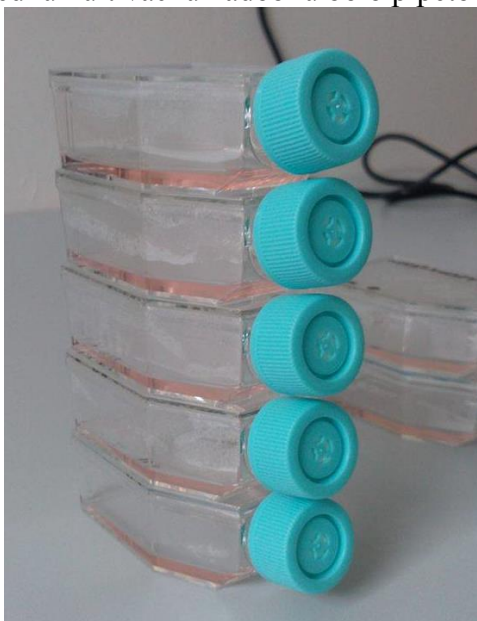
#### 4.23.3 Dilučné testy

Do jamiek 96 jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných vždy 150  $\mu$ l kvasinkových buniek s tekutým médiom a 50  $\mu$ l skúmanej látky (extrakt, roztok častíc). V čase 0 a po 24 hodinách kultivácie pri teplote 37°C bola pomocou zákalu meraného pri 630 nm odčítaná koncentrácia buniek. Ako blank bolo použitých 150  $\mu$ l kvasinkových buniek zriedených 50  $\mu$ l destilovanej vody.

### 4.24 Testy cytotoxicity na bunkách ľudskej pokožky

#### 4.24.1 Kultivácia keratinocytov

Keratinocyty HEK (102-105a) boli kultivované v komerčnom médiu (KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium). Kultivačné nádobky (Obrázok 22) boli uchovávané v kultivačnom inkubátore vytemperovanom na 37°C s obsahom 5% CO<sub>2</sub>. Pri výmene média bola zásobná fľaška s médiom, ktorý bola uchovávaná v chladničke pri 4°C vytemperovaná na laboratórnu teplotu aby sa predišlo teplotnému šoku buniek. Pred výmenou média boli kultivačné nádobky skontrolované pod inverzným mikroskopom na prítomnosť kontaminácie a bol skontrolovaný stav a priľnavosť buniek na dne nádobky. Výmena média prebiehala za sterilných podmienok a na jednu kultivačnú nádobku bolo pipetované 5 ml média.



Obrázok 22: Kultivačné nádobky s keratinocytmi

#### 4.24.2 MTT test

Z kultivačnej nádobky bolo sterilne vyliate médium, bunky boli dvakrát až trikrát poriadne prepláchnuté pripraveným sterilným PBS pufrom (na jedno prepláchnutie bolo použitých cca 5 ml). Po prepláchnutí bolo pridané 0,5 ml enzýmu trypsin a fľaštička bola vložená do termostatu (37 °C) na päť až desať minút. Podinverzným mikroskopom skontrolované, či došlo k odlúčeniu buniek od dna fľaštičky.

Po odlúčení všetkých buniek bolo do nádoby sterilne pridaných 5 ml PBS pufru a bunky v ňom boli homogenizované a prenesené do sterilnej centrifugačnej skúmavky. Následne boli bunky centrifugované (cca 5 min, 360 g), pufor bol zliaty (bunky boli usadené v peletke na dne). Do centrifugačnej skúmavky bolo pridané malé množstvo média, bunky v ňom boli rozsuspendované. Bola určená koncentrácia buniek počítaním na Bürkerovej komôrke. Bunky boli vhodne zriedené novým médiom tak, aby ich koncentrácia bola  $2 \cdot 10^4$  buniek/100  $\mu$ l. Takto pripravená suspenzia buniek bola po 100  $\mu$ l rozpipetovaná na 96- jamkovú doštičku. Prítomnosť buniek bola skontrolovaná pomocou mikroskopu a doštička bola umiestnená na 24 hodín do kultivačného termostatu. Po 24 hodinách boli pridané (vždy po 20  $\mu$ l) sterilné testované častice v rôznych koncentráciách a následne boli bunky inkubované 24 hodín. Napokon bolo pridané sterilné MTT (20  $\mu$ l) o koncentrácii 2,5 mg/ml v PBS pufri a bunky boli ďalej inkubované v kultivačnomtermostate po dobu troch hodín. Na záver bolo pridané po 100  $\mu$ l 10% roztok SDS v PBS pufri a doštička bola ponechaná v tme pri laboratórnej teplote ďalších 24 hodín. Po 24 hodinách bola zmeraná absorbanca pomocou ELISA readeru pri 560 nm [59].

V prípade testovania cytotoxicity vlákien bola použitá 6- jamková doštička. Testované vlákna boli pripravované sterilne a zvážené.

#### **4.24.3 Stewartova metóda stanovenia koncentrácie lipidov**

Pre presnú kvantifikáciu lipidov, ktoré pri MTT teste pôsobia na keratinocyty, bola použitá Stewartova metóda. Do 15 ml centrifugačnej skúmavky bolo napipetovaných 50  $\mu$ l skúmaného vzorku (roztoku lipozómov), bolo pridaných 450  $\mu$ l destilovanej vody. Následne boli pridané 2 ml roztoku ferothiokyanátu amonného, ktorý obsahoval 0,1 M chloridu železitého a 0,4 M thiokyanatanu amonného. Boli pridané 3 ml chloroformu a skúmavky boli vortexované 20 sekúnd. Vzorky boli centrifugované 5 minút pri otáčkách 1000 rpm. Pre spektrofotometrické stanovenie pri  $\lambda = 450$  nm v sklenenej kyvete bola odobratá spodná chloroformová fáza. Pre kalibráciu bol použitý roztok lecitínu v chloroforme v koncentračnom rozmedzí 0 – 0,25 mg/ml. Rovnica kalibračnej priamky je  $y = 3,8591 \cdot x$  [mg].

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

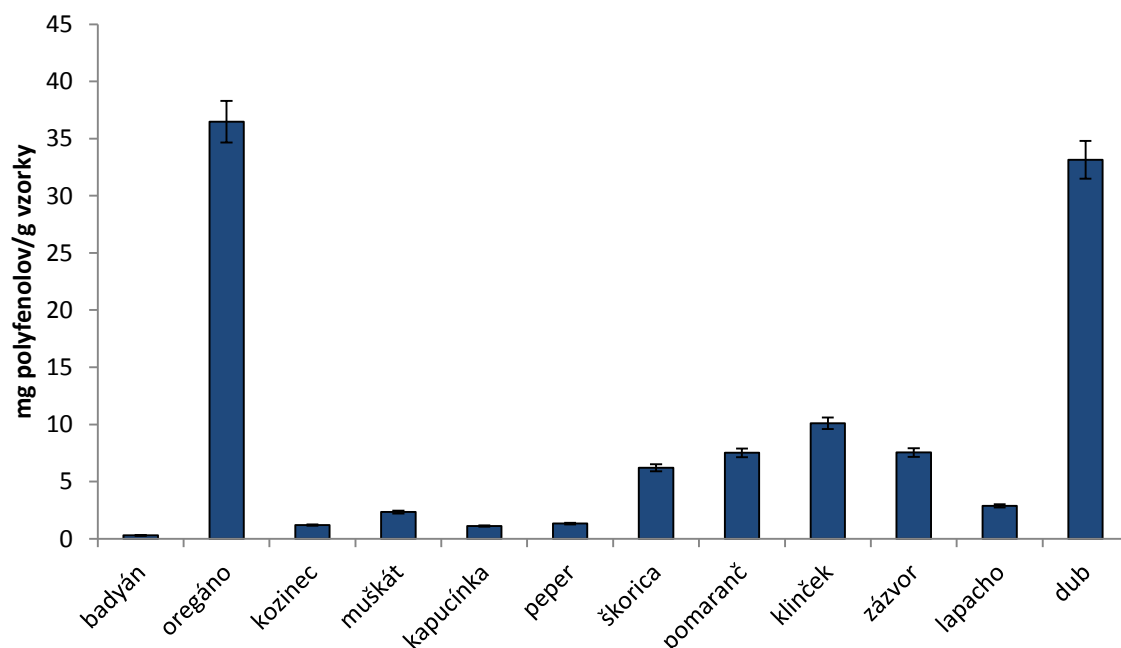
Predložená diplomová práca bola zameraná na prípravu nových materiálov s antimikrobiálnym účinkom a testovaniu ich účinku. V práci boli pripravené nanočastice i nanovlákná z prírodného polyméru. Ďalej bola uskutočnená funkcionalizácia týchto častíc aj vlákien antimikrobiálnymi zložkami. Ako antimikrobiálne látky boli použité predovšetkým prírodné extrakty z rastlinných olejov. Testované boli možnosti enkapsulácie bylenných a koreniových extraktov z kozinca, badyánu, klinčeka, oregana, zázvoru, škorice, pepru, lapacha, kapucínky, dubovej kôry, pomarančovej kôry a muškátového oriešku. Tieto vzorky boli najprv charakterizované a následne boli vybrané extrakty použité k enkapsulácii. Taktiež bola testovaná možnosť enkapsulácie klotrimazolu. U všetkých použitých antimikrobiálnych zložiek bola sledovaná ich antimikrobiálna aktivita pred a po enkapsulácii do rôznych typov častíc a vlákien. Na záver bola vykonaná charakterizácia účinku častíc a vlákien na humánne bunky.

### 5.1 Charakterizácia rastlinných extraktov

V práci boli zo zvolených bylín a korení pripravené vodné i olejové extrakty. K extrakcii olejov bola použitá metóda podľa Folcha, presný postup je uvedený v kapitole 4.5.2. Príprava vodných extraktov je popísaná v kapitole 4.5.1. Všetky pripravené extrakty boli charakterizované na obsah celkových polyfenolov a obsah celkových flavonoidov. Taktiež bola sledovaná ich antioxidačná aktivita pomocou ABTS radikálu a antimykotická aktivita. V prípade olejových extraktov bola tiež sledovaná výťažnosť pri ich extrakcii a obsah mastných kyselín.

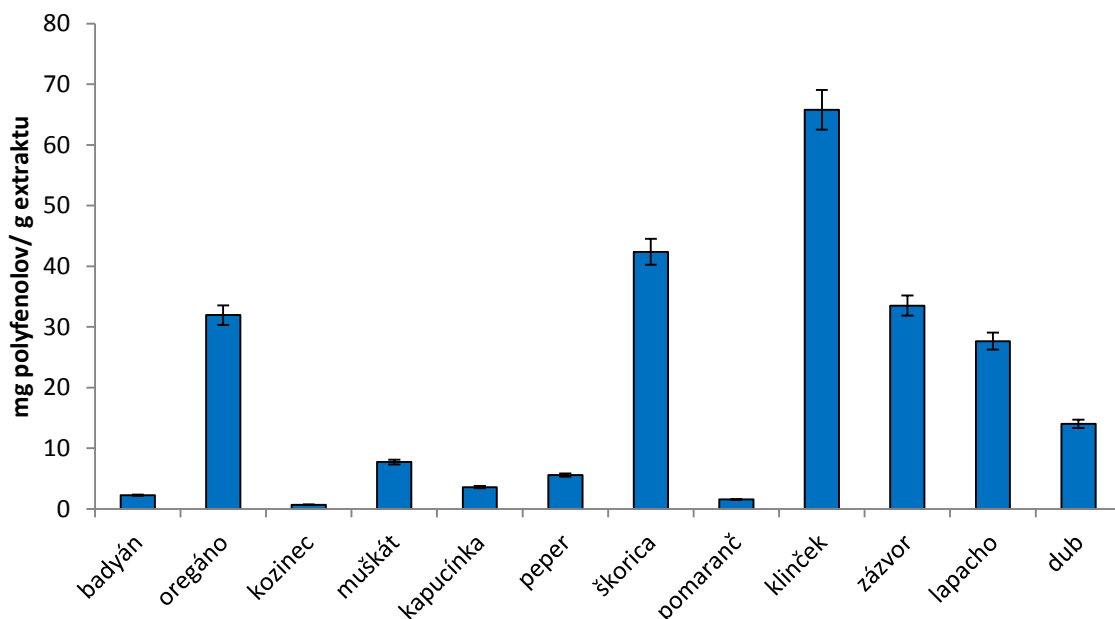
#### 5.1.1 Obsah polyfenolov v extraktoch

Obsah polyfenolov bol meraný podľa postupu stanovenom v bode 4.7. Koncentrácia polyfenolov bola vypočítaná z kalibračnej rovnice  $y = 2,2263 x$ . Celkový obsah polyfenolov v extraktoch je zobrazený na nasledujúcich obrázkoch (Obrázok 23 a Obrázok 24). Každý z extraktov bol analyzovaný trikrát a výsledkom je priemerná hodnota z týchto meraní.



Obrázok 23: Obsah polyfenolov vo vodných extraktoch

Čo sa týka vodných extraktov, najviac polyfenolov na gram vzorky obsahoval extrakt oregána (36,47 mg/g) a dubovej kôry. Nasleduje klinček, zázvor a škorica. Najmenší obsah polyfenolov bol zistený u extraktu z badyánu (0,3 mg/g).

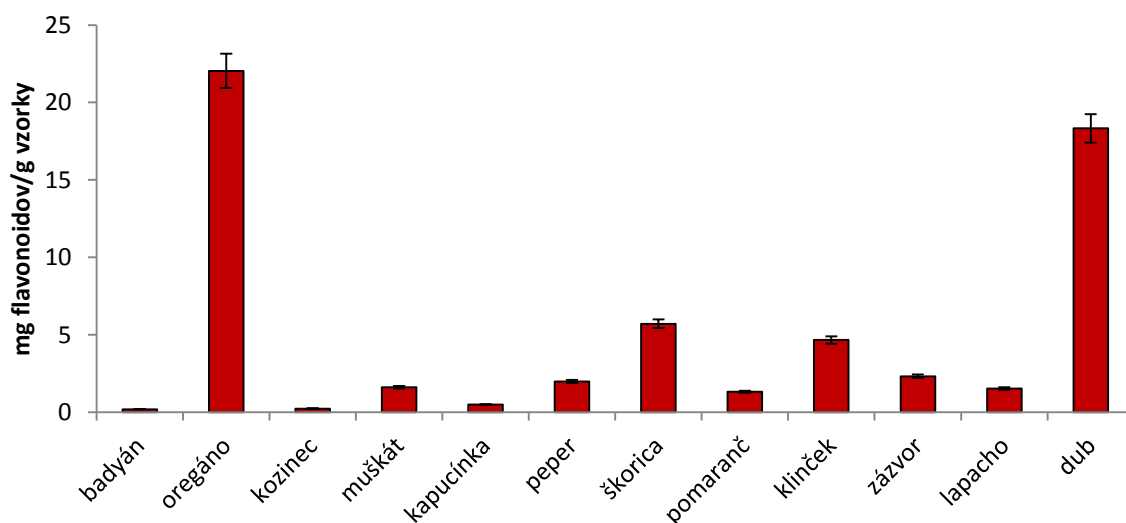


Obrázok 24: Obsah polyfenolov v lipidových extraktoch

U lipidových extraktov bol najvyšší obsah polyfenolov na gram extraktu zaznamenaný u klinčekového extraktu (65,77 mg/g), nasleduje škorica, zázvor a oregano. Najmenej polyfenolov obsahoval lipidový extrakt z kozinca (0,71 mg/g). U všetkých lipidových extraktov s výnimkou oregana, pomaranča a dubovej kôry bol nameraný vyšší obsah polyfenolov ako u vodných extraktov.

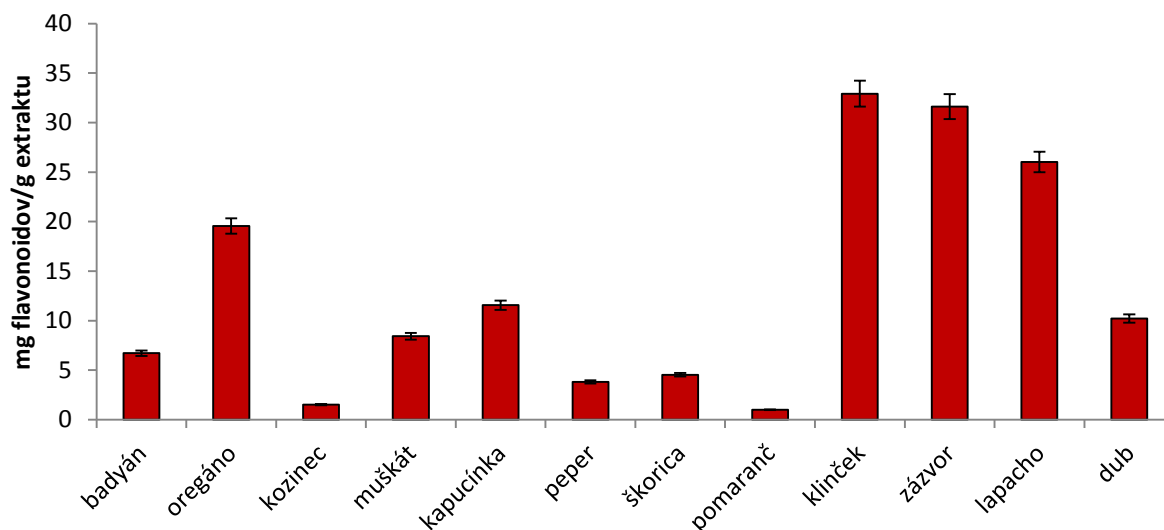
### 5.1.2 Obsah flavonoidov v extraktoch

Obsah flavonoidov bol meraný pomocou postupu popísanom v bode 4.8 a vypočítaný z kalibračnej rovnice  $y = 3,4297 x$ . Každý z extraktov bol analyzovaný 3 krát a výsledkom je priemerná hodnota z týchto meraní.



Obrázok 25: Obsah flavonoidov vo vodných extraktoch

Najvyšší obsah flavonoidov vo vodných extraktoch bol zistený u oregána (22,04 mg/g) a dubovej kôry, najnižší u kozinca a badyánu (0,19 mg/g).

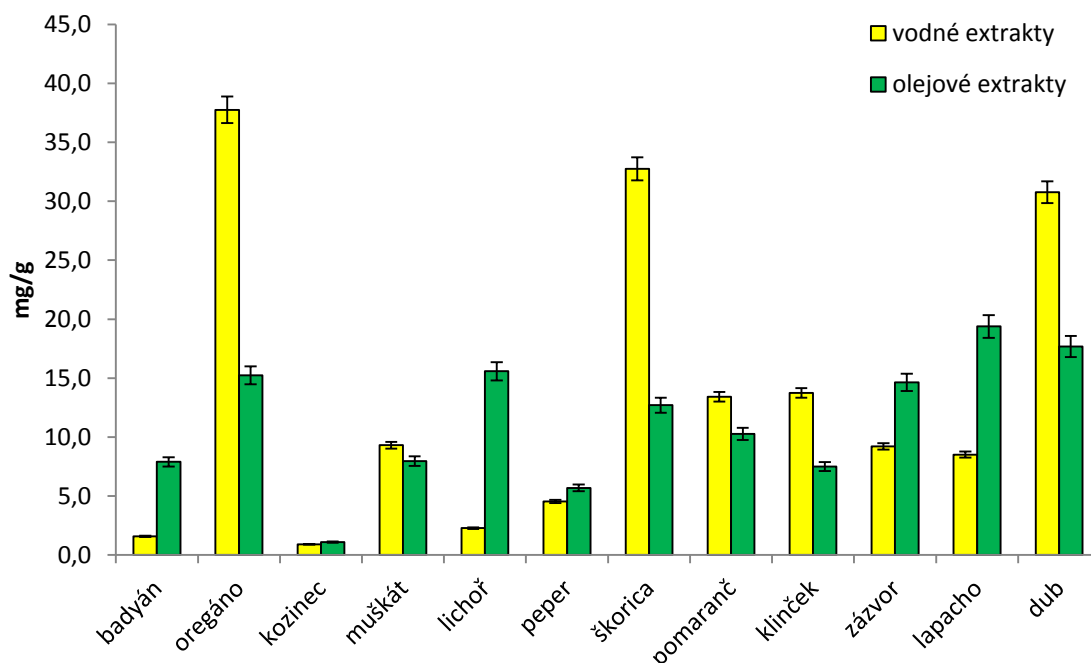


Obrázok 26: Obsah flavonoidov v lipidových extraktoch

U lipidových extraktov viedol v obsahu flavonoidov klinček (32,91 mg/g) a zázvor a vysoký obsah flavonoidov bol zaznamenaný aj u lapacha. Tak ako pri stanovení polyfenolov, aj pri stanovení flavonoidov bol vyšší obsah nameraný u lipidových extraktov, výnimku predstavuje len oregano a škorica.

### 5.1.3 Antioxidačná aktivita extraktov

Antioxidačná aktivita extraktov bola stanovená postupom uvedeným v bode 4.6. Hodnota bola vzťahovaná na ekvivalent Troloxu v mg na gram vzorku a výsledky zhrňuje Obrázok 27, ktorý umožňuje taktiež porovnanie antioxidačnej aktivity vodných a lipidových extraktov.

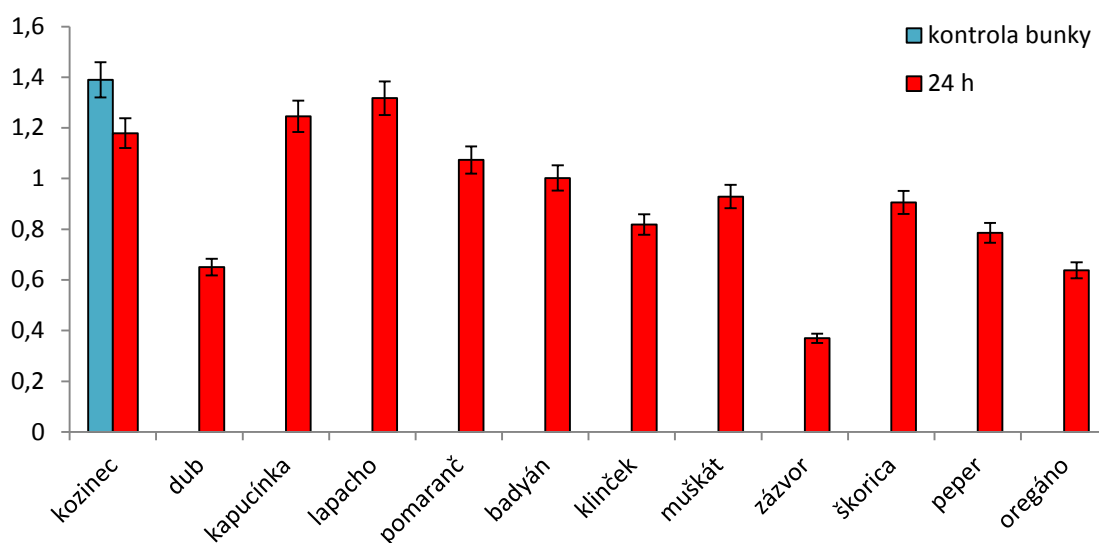


Obrázok 27: Antioxidačná aktivita extraktov

Najvyššiu hodnotu antioxidačnej aktivity dosiahol vodný extrakt oregana, a to 37 mg/g. Nasleduje vodný extrakt škorice, dubovej kôry, klinčeku a pomarančovej kôry. Čo sa týka lipidových extraktov, najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity boli zaznamenané u čaju lapacho, dubovej kôry, kapucínky a oregana. Najnižšia hodnota bola zaznamenaná pri extraktoch z kozinca.

#### 5.1.4 Antimykotická aktivita extraktov

Antimykotická aktivita vodných extraktov bola prevedená podľa pracovného postupu popísaného v bode 4.23.3. Každá vzorka bola meraná trikrát a graf (Obrázok 28) zobrazuje priemerný výsledok z týchto meraní. Bol stanovovaný inhibičný účinok vzoriek na rast kvasinkových buniek.



Obrázok 28: Antimykotické pôsobenie vodných extraktov

Pre testovanie bola zvolená koncentrácia vodných extraktov 0,25 g/ml. Pri danej koncentrácii bol pozorovaný antimykotický účinok všetkých extraktov. Najvyššia schopnosť inhibovať rast kvasinkových buniek bola zaznamenaná u vodného extraktu zo zázvoru, dubovej kôry, oregana, peporu a klinčeka.

Taktiež bol prevedený jamkový test na Petriho miskách, ktorého postup je uvedený v bode 4.23.2.1. Sledované inhibičné zóny sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 2: Inhibičné zóny vodných extraktov



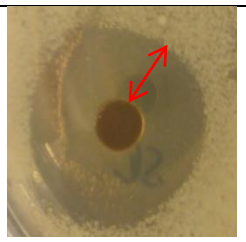

vzorka	oregano	klinček	škorica
veľkosť zóny [mm]	2	8	4
obrázok			

U ostatných vodných extraktov neboli pozorované žiadne inhibičné zóny.

Pre stanovenie antimykotickej aktivity lipidových extraktov bolo z dôvodu ich konzistencie a komplikovanej manipulácie kôli lepivosti zvolené testovanie na Petriho miskách pomocou difúzneho testu, ktorého pracovný postup je uvedený v bode 4.23.2.2.

Ako pri predošlých testoch, aj tu bola sledovaná schopnosť inhibície rastu kvasinkových buniek. Nasledujúca tabuľka zhrňuje pozorované inhibičné zóny, ktoré boli odčítavané po 24 hodinách pôsobenia lipidových extraktov.

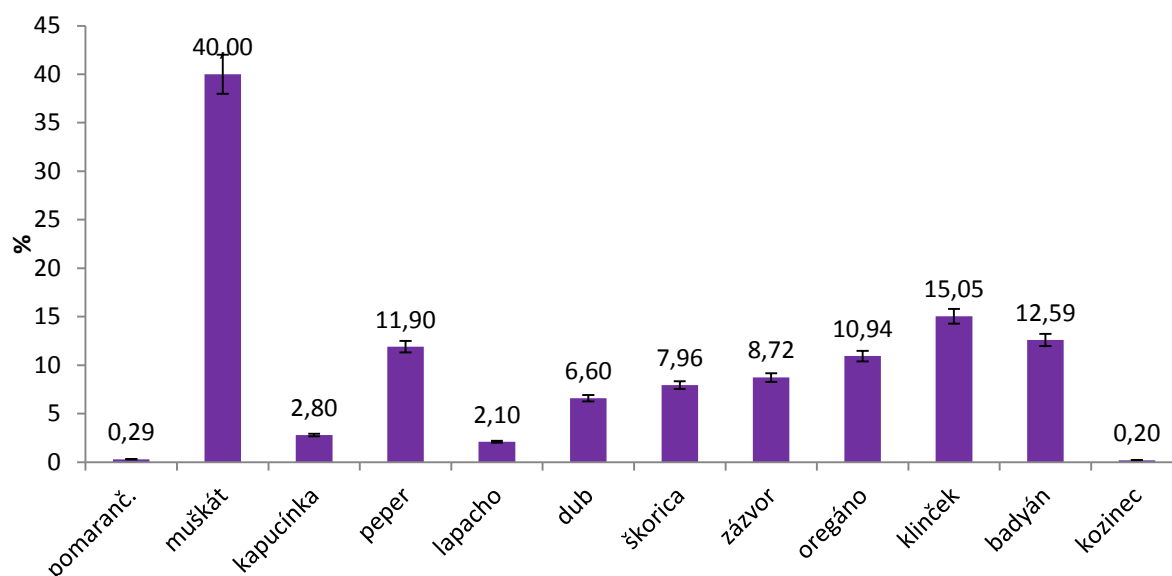
Tabuľka 3: Inhibičné zóny lipidových extraktov

vzorka	oregano	klinček	škorica	peper
veľkosť zóny [mm]	6	8	8	3
obrázok				

U ostatných lipidových extraktov neboli pozorované žiadne inhibičné zóny. Tento test sa dá považovať len za orientačný, pretože z dôvodu komplikovanej manipulácie s lipidovými extraktmi nebolo možné určiť presné množstvo vzorku umiestneného na Petriho miskú.

### 5.1.5 Výťažnosť lipidových extraktov

Výťažnosť lipidových extraktov bola vypočítaná ako percento hmotnosti extraktu k pôvodnej navážke vzorky a zhrňuje ju nasledujúci graf.



Obrázok 29: Výťažnosť lipidových extraktov

Najvyšší výťažok bol dosiahnutý u muškátového oriešku. Orišky sú vo všeobecnosti masné, čiže obsahujú veľa lipidických látok (40 %). Naopak najnižšia výťažnosť bola zaznamenaná u kozinca, a to len 0,20 %.

Extraktý mali príjemnú vôňu daného vzorku a veľmi hustú až voskovitú konzistenciu. Vo všeobecnosti je možné skonštatovať, že u väčšiny extraktov sa výťažnosť pohybovala medzi 6 a 15 % pôvodnej hmotnosti vzorku.



### 5.1.6 Obsah mastných kyselín stanovených pomocou GC/FID

Vybrané lipidové extrakty, z ktorých boli pripravované PHB vlákna, boli podrobené analýze obsahu mastných kyselín pomocou plynovej chromatografie s fotoionizačným detektorom. Nasledujúca tabuľka zhrňuje prítomnosť metylesterov mastných kyselín v skúmaných vzorkách. GC/FID spektrá sú umiestnené v prílohách.

Tabuľka 4: Mastné kyseliny v lipidových extraktoch

lipidový extrakt	mastné kyseliny
škorica	k. kaprylová, k. laurová, k. pentadekánová
klinček	k. kaprylová, k. kaprinová, k. laurová
oregano	k. undekánová, k. palmitová
dubová kôra	-

U dubovej kôry neboli zaznamenané žiadne píky. To mohlo byť spôsobené neprebehnutou transesterifikáciou lipidového extraktu. Tento extrakt sa totiž veľmi neochotne rozsuspenderoval v hexáne a nedošlo k jeho úplnému rozpusteniu.

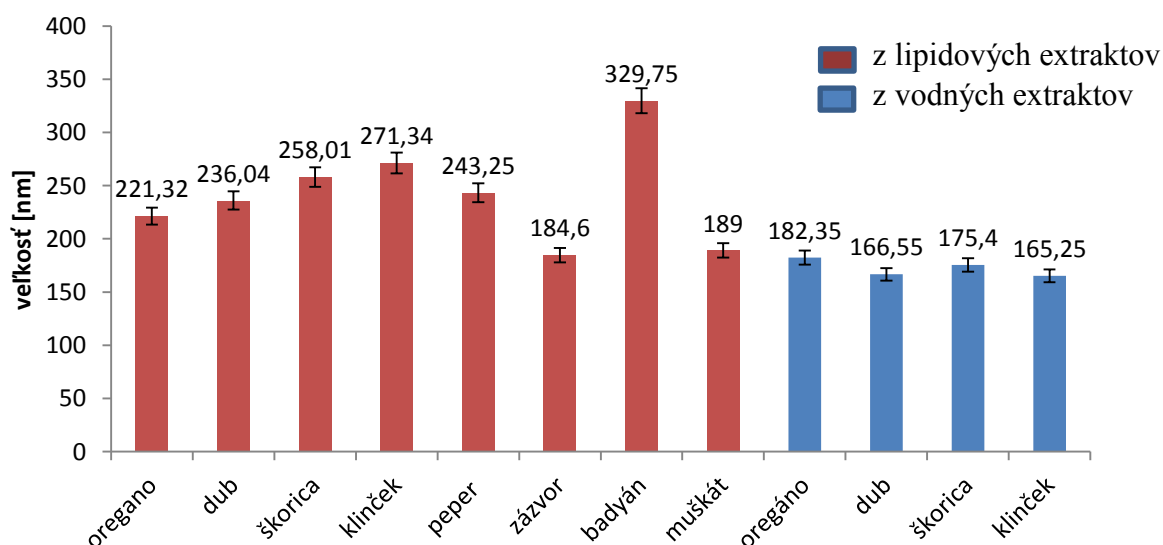
## 5.2 Príprava častíc

Častice boli pripravované pracovným postupom popísaným v bode 4.10. Pre prípravu lipozém boli zvolené vodné a lipidové extrakty s najvyšším obsahom polyfenolov, flavonoidov a dobrou antioxidačnou aktivitou. Z vodných extraktov boli zvolené vzorky klinčeka, oregana, škoricie a dubovej kôry. Z olejových extraktov boli vybrané klinček, škoricie, peper zázvor, oregano, dubová kôra, badyán a muškátový oriešok.

Celkovo bolo pripravených 29 typov častíc, ktoré boli ďalej charakterizované na veľkosť, enkapsulačnú účinnosť, koloidnú stabilitu v roztoku pomocou stanovenia zeta potenciálu, krátkodobú alebo dlhodobú stabilitu. Pripravené častice boli využité i na antimykotické testy a testy cytotoxicity na ľudských keratinocytoch.

### 5.2.1 Veľkosť častíc

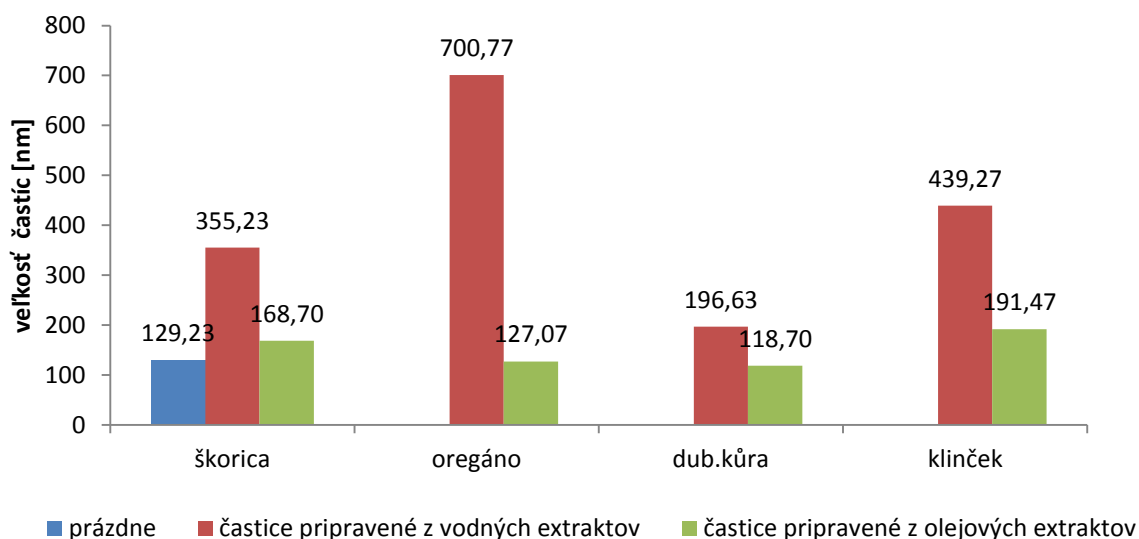
Veľkosť častíc bola meraná pomocou dynamického rozptylu svetla na prístroji Malvern Zetasizer ZS a výsledky sú zobrazené na nasledujúcom obrázku (Obrázok 30).



Obrázok 30: Priemerná veľkosť lipozém

Priemerná veľkosť lipozém pripravených z vodných extraktov sa pohybovala od 165 do 182 nm a neboli zaznamenané veľké rozdiely medzi jednotlivými druhmi častíc.

U lipozómov pripravených z lipidových extraktov boli zaznamenané rozdiely, najväčšie dosiahli veľkosť 329,75 nm. Všetky tieto lipidové lipozómy boli väčšie ako vodné, je preto možné predpokladať, že kapacita lipidovej dvojvrstvy je väčšia ako kapacita jadra lipozómu, kam boli enkapsulované vodné extrakty. Ďalej boli testované veľkosti lipozómových častíc s prídavkom PHB.



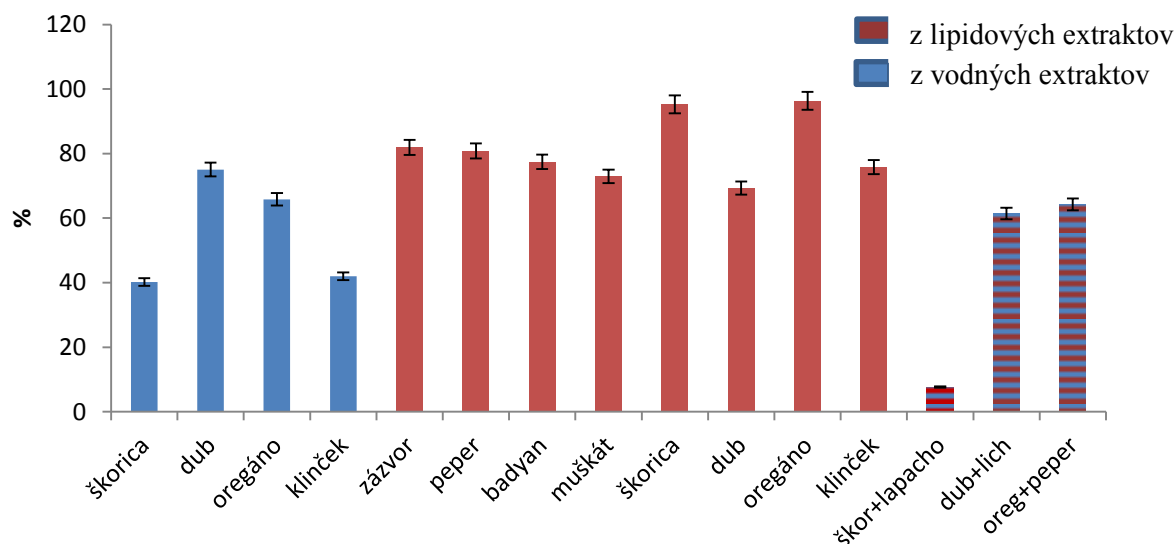
Obrázok 31: Priemerná veľkosť lipozómov s obsahom PHB

Je predpoklad, že PHB by mohlo v štruktúre lipozómu fungovať ako stabilizátor lipidovej dvojvrstvy, podobne ako je to pri cholesterole. Častice s prídavkom PHB pripravené z vodných extraktov dosiahli výrazne väčšiu veľkosť ako častice bez jeho prídavku. Túto skutočnosť je možné zdôvodniť tým, že PHB bolo enkapsulované do lipidovej dvojvrstvy, kde tým pádom neostalo toľko priestoru pre lipidové extrakty a preto sú tieto častice menšie. Naopak vodný extrakt bol enkapsulovaný do hydrofilného jadra lipozómu, takže tieto lipozómy obsahovali viac enkapsulovaných zložiek, preto sú väčšie.

### 5.2.2 Enkapsulačná účinnosť

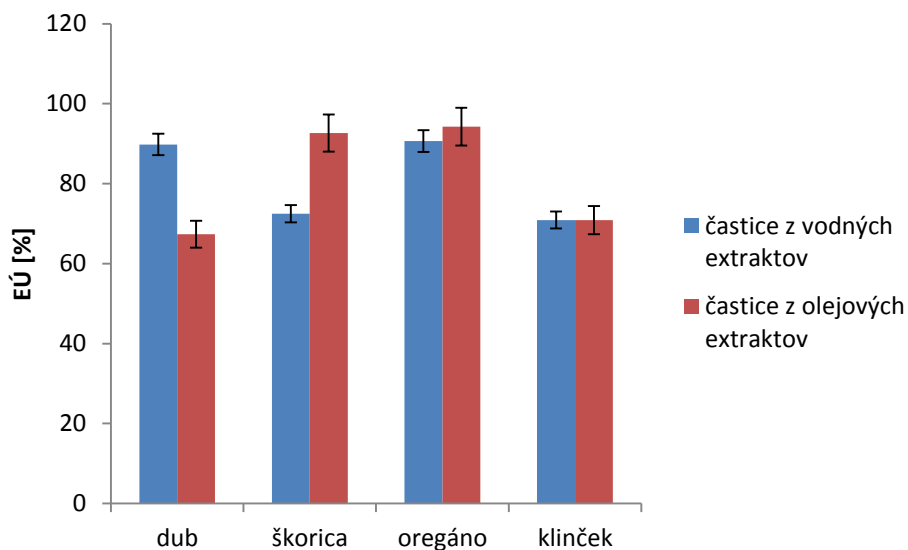
Enkapsulačná účinnosť bola vypočítaná ako rozdiel obsahu polyfenolov v extrakte pred a po enkapsulácii do lipozómových častíc. Podrobný postup je uvedený v kapitole 4.11.

Najvyššia enkapsulačná účinnosť u lipozómových častíc bola zaznamenaná u lipidového extraktu zázvoru, najnižšia u kombinovaných lipozómov obsahujúcich vodný extrakt škorice a lipidový extrakt lapacho. Z grafu je viditeľné, že lipidové extrakty dosahovali lepšie enkapsulačné účinnosti, a to od 72 do 82 %. Pri vodných extraktoch boli zaznamenané väčšie rozdiely v enkapsulačnej účinnosti. Čo sa týka kombinovaných lipozómov pripravených z vodných a lipidových extraktov, najnižšiu hodnotu dosiahla kombinácia vodného extraktu škorice a lipidového extraktu lapacha (7,67 %). U zvyšných dvoch typov kombinovaných lipozómov bola dosiahnutá celkom vysoká enkapsulačná účinnosť, a to 61,4 % u častíc obsahujúcich extrakt z dubovej kôry a kapucínky a 64,27% u častíc obsahujúcich oregáno a peper. U týchto častíc bola enkapsulačná účinnosť porovnateľná s danou vzorkou v jednozložkových časticiach.



Obrázok 32: Enkapsulačná účinnosť lipozómov

Bola taktiež porovnaná enkapsulačná účinnosť vodných a lipidových extraktov s prídavkom PHB. Hodnoty EÚ dosahovali od 67 do 94%, čo je možné považovať za dobrú schopnosť enkapsulácie. Neboli zaznamenané veľmi výrazné rozdiely v enkapsulácii vodného a lipidového extraktu.



Obrázok 33: Enkapsulačná účinnosť lipozómov s prídavkom PHB

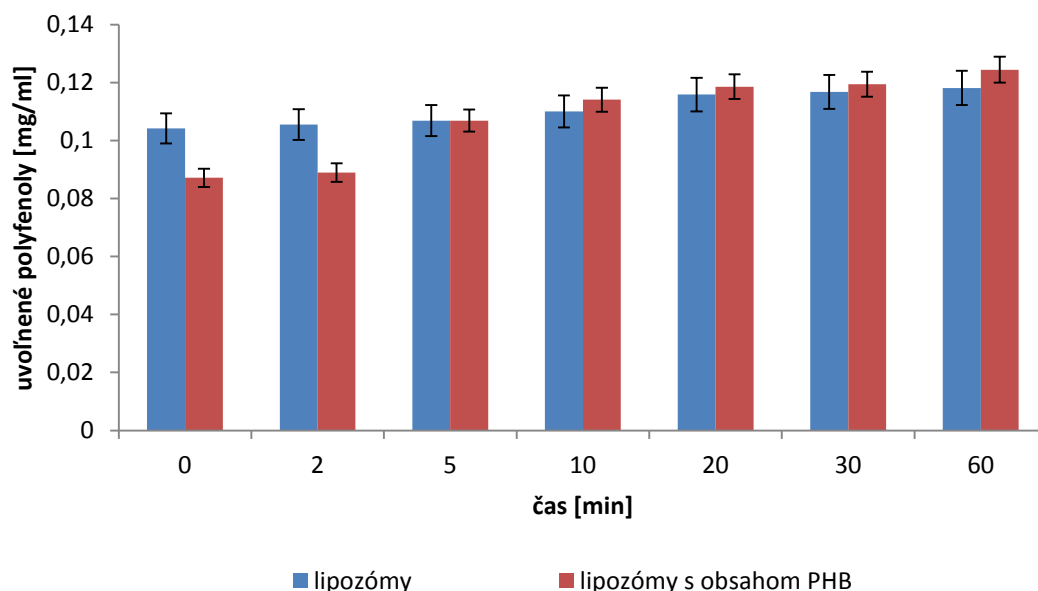
V nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 5) sú uvedené presné množstvá enkapsulovaných polyfenolov na 1 ml častíc. Najviac polyfenolov obsahoval 1 ml oreganových častíc s prídavkom PHB pripravených z vodného extraktu oregana, a to 3,3077 mg/ml a najmenej polyfenolov bolo enkapsulovaných v kombinovaných lipozómoch obsahujúcich škoricu a lapacho.

Tabuľka 5: Porovnanie enkapsulašnej účinnosti do jednotlivých typov častíc [mg/ml]

	mg/ml				
	bez PHB			s PHB	
	vodné	olejové	kombinácia	vodné	lipidové
škorica	0,1046	1,4238		0,4498	1,139
dub	0,2488	0,2583		2,9767	0,2033
oregáno	0,2401	0,9654		3,3077	0,934
klinček	0,0424	1,2136		0,7164	1,1513
zázvor	0,593				
peper	0,1502				
badyán	0,047				
muškát	0,1435				
škorica+lapacho		0,0143			
dub.kôra+kapucínka		0,3637			
oregano+peper		0,322			

### 5.2.3 Krátkodobá stabilita častíc

Krátkodobá stabilita častíc bola stanovená na základe uvoľňovania enkapsulovaných polyfenolov v čase 0, 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minút do etanolu pri laboratórnej teplote. Pre toto stanovenie boli pripravené lipozómy obsahujúce vodný extrakt klinčeku s a bez prídavku PHB, aby bolo možné porovnať vplyv prídavku PHB na uvoľňovanie enkapsulovaných zložiek.



Obrázok 34: Krátkodobá stabilita lipozómov

Vplyv prídavku PHB je viditeľný do času 5 minút. Je možné konštatovať, že lipozómy boli prvých 5 minút stabilizované týmto prídavkom. Uvoľňovanie prebiehalo postupne a po 10 minútach rýchlejšie ako u častíc bez prídavku PHB.

Nasledujúca tabuľka zobrazuje percentá uvoľnených polyfenolov z pôvodného enkapsulovaného množstva.

Tabuľka 6: Uvoľnené polyfenoly

čas (min)	0	2	5	10	20	30	60
bez PHB (%)	73,3	74,25	75,2	77,41	81,51	82,15	83,09
s PHB (%)	61,29	62,56	75,2	80,25	83,41	84,04	87,52

Hneď po pridaní etanolu k časticiam nastalo uvoľnenie prevažnej väčšiny enkapsulovaných polyfenolov (73,3 % a 61,29 %). Po uplynutí 1 hodiny bolo uvoľnených už 83,09 % a 87,52 %. Je teda možné predpokladať, že za daných podmienok nastane uvoľnenie všetkých enkapsulovaných polyfenolov extraktu klinčeka z lipozómov do etanolu v priebehu dvoch hodín.

Z toho vyplýva, že po aplikácii častíc na ľudskú pokožku sa s najväčšou pravdepodobnosťou budú aktívne látky uvoľňovať postupne v priebehu niekoľkých hodín. Pre stanovenie tejto rýchlosti uvoľňovania aktívnych látok bola použitá micelárna voda Mixa. Z dôvodu silnej interakcie micelárnej vody s činidlom pre stanovenie polyfenolov nemohlo byť toto uvoľňovanie správne vyhodnotené.

#### 5.2.4 Dlhodobá stabilita častíc

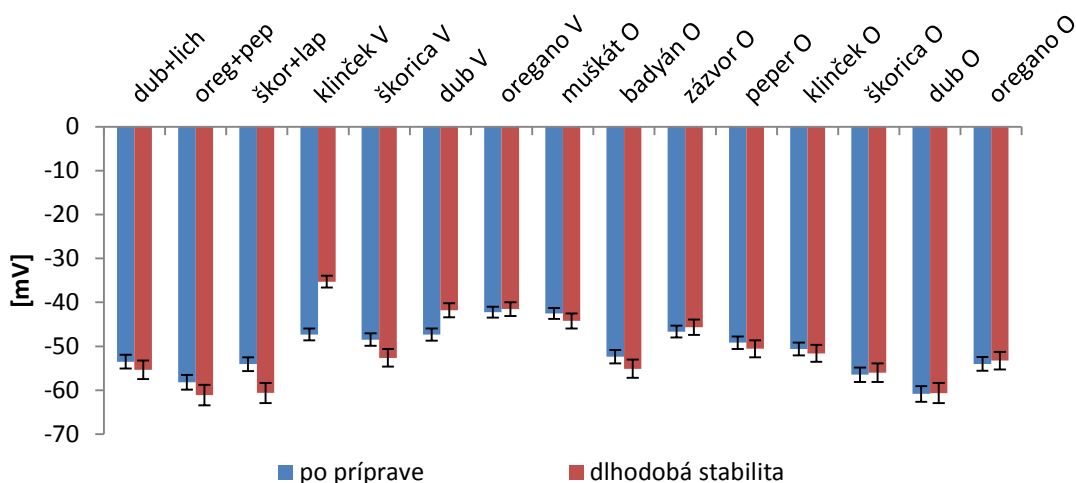
Dlhodobá stabilita enkapsulovaných zložiek bola stanovovaná pomocou určenia množstva polyfenolov uvoľnených po mesiaci skladovania vo vodnom prostredí v chladničke pri teplote 4°C.

Po mesiaci skladovania nebolo u žiadnych z testovaných vzorkov pozorované uvoľňovanie polyfenolov do vodného prostredia. Nedá sa presne s istotou povedať, že nedochádzalo k uvoľňovaniu. Polyfenolické zložky mohli byť po uvoľnení degradované.

### 5.3 Koloidná stabilita častíc v roztoku

Koloidná stabilita častíc v roztoku bola meraná pomocou zeta potenciálu pracovným postupom popísaným v kapitole 5.3.

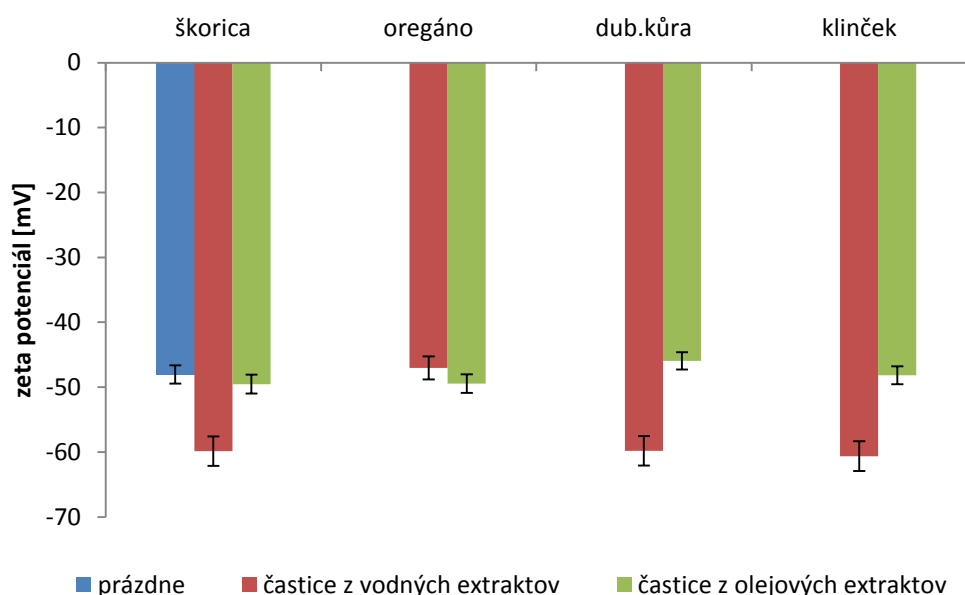
Z nasledujúcich obrázkov (Obrázok 35 a Obrázok 36) je možné konštatovať, že všetky pripravené lipozómy je možné považovať za koloidne stabilné, pretože hodnota zeta potenciálu všetkých vzoriek sa nachádza za hranicou stability -30 mV a to i po mesiaci skladovania vo vodnom prostredí.



Obrázok 35: Koloidná stabilita lipozómov

Veľmi vysokou stabilitu vykazovali predovšetkým všetky kombinované lipozómy a tiež lipozómy obsahujúce extrakty z oregana a pepru a škorice (Obrázok 35).

Z grafu (Obrázok 36) je viditeľné, že veľmi dobrú stabilitu dosahovali i všetky testované lipozómy s obsahom PHB.



Obrázok 36: Koloidná stabilita lipozómov s obsahom PHB

U častíc s prídavkom PHB vyššiu koloidnú stabilitu dosahovali častice s obsahom vodných extraktov (s výnimkou oregana, kde medzi vodným a lipidovým extraktom nebol zaznamenaný výrazný rozdiel).

Nasledujúca tabuľka porovnáva vplyv prídavku PHB na koloidnú stabilitu lipozómov pripravených z vodných extraktov:

Je možné konštatovať, že prídavok PHB stabilizuje dané častice, pretože bola pri všetkých typoch častíc obsahujúcich rovnaký vodný extrakt zaznamenaná nižšia hodnota zeta potenciálu, čo značí vyššiu koloidnú stabilitu častíc v roztoku.

## 5.4 Príprava vlákien

Vlákná boli pripravované metódou elektrospinningu a force spinningu na rotačnom zvlákňovacom prístroji. Postup prípravy je opísaný v bodoch 2.4 a 2.5.

Celkovo bolo pripravených 37 typov vlákien. Navzájom sa líšili koncentráciou PHB, spôsobom prípravy a pridávanými zložkami. Rôzne koncentrácie PHB (0,5–3 %) boli použité pre optimalizáciu prípravy vlákien. Ďalej boli pripravené vlákna s rôznym obsahom klotrimazolu, tieto vlákna boli následne podrobené testovaniu antimykotickej aktivity (4.23.1).

Všetky pripravené vlákna boli uchovávané v suchom stave v Petriho miskách pri laboratórnej teplote. Ako najvhodnejšia koncentrácia PHB sa pre elektrospinning ukázala koncentrácia 2%. Preto bola táto koncentrácia PHB použitá taktiež pre prípravu vlákien s obsahom lipidových extraktov, ktoré boli využité na testovanie antimykotickej a antioxidačnej aktivity a pri štúdiu postupného uvoľňovania aktívnych látok z vlákien. Pre prípravu vlákien s obsahom lipidových extraktov boli použité extrakty zo škorice, klinčeka, oregana a dubovej kôry, pretože práve tieto extrakty mali dobré antioxidačné účinky, vysoký obsah polyfenolov, flavonoidov a aj antimykotické účinky.

## 5.5 Charakterizácia vlákien s obsahom lipidových extraktov

U pripravených vlákien bola sledovaná predovšetkým ich antimykotická a antioxiadčná aktivita.

### 5.5.1 Antioxidačná aktivita vlákien

Antioxidačná aktivita vlákien bola stanovená roztokovou metódou popísanou v kapitole 4.17. Bola porovnaná antioxidačná aktivita prázdnych PHB vlákien a vlákien s obsahom lipidového extraktu zo škorice, klinčeka, oregana a dubovej kôry.

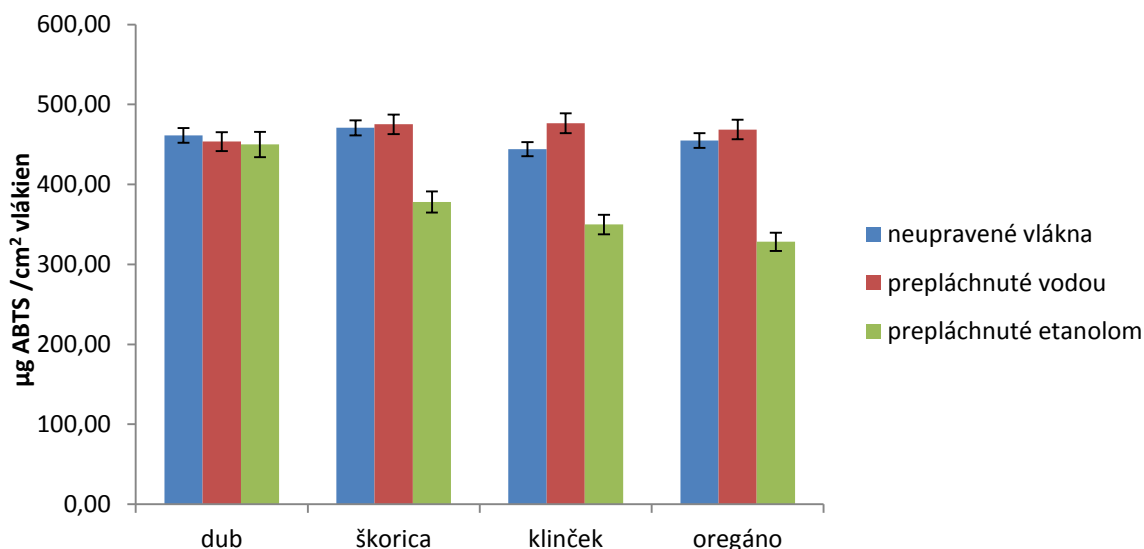


*Obrázok 37: Porovnanie antioxidačnej účinnosti prázdnych PHB vlákien (vľavo) a s obsahom klinčekového extraktu (vpravo)*

Na fotografii (Obrázok 37) je zobrazený rozdiel v antioxidačnom pôsobení čistých vlákien a vlákien s obsahom lipidového extraktu z klinčeka po 10 minútach pôsobenia 1 cm<sup>2</sup> vlákien na roztok radikálu ABTS (zelené sfarbenie). Lipidový extrakt úplne odfarbil skúmaný roztok radikálu, čiže bol schopný na tento radikál pôsobiť antioxidačne. Priebeh odfarbovania zeleného roztoku radikálu ABTS je zobrazený na nasledujúcom obrázku:



*Obrázok 38: Antioxidačné pôsobenie vlákna obsahujúceho škoricový extrakt*



Obrázok 39: Antioxidačná aktivita vlákien

Antioxidačná aktivita bola stanovovaná u neupravených vlákien a u vlákien po prepláchnutí vo vode a v etanole. Preplachovanie trvalo 5 minút. Všetky skúmané vlákna obsahujúce lipidový extrakt vykazovali veľmi vysokú antioxidačnú aktivitu.

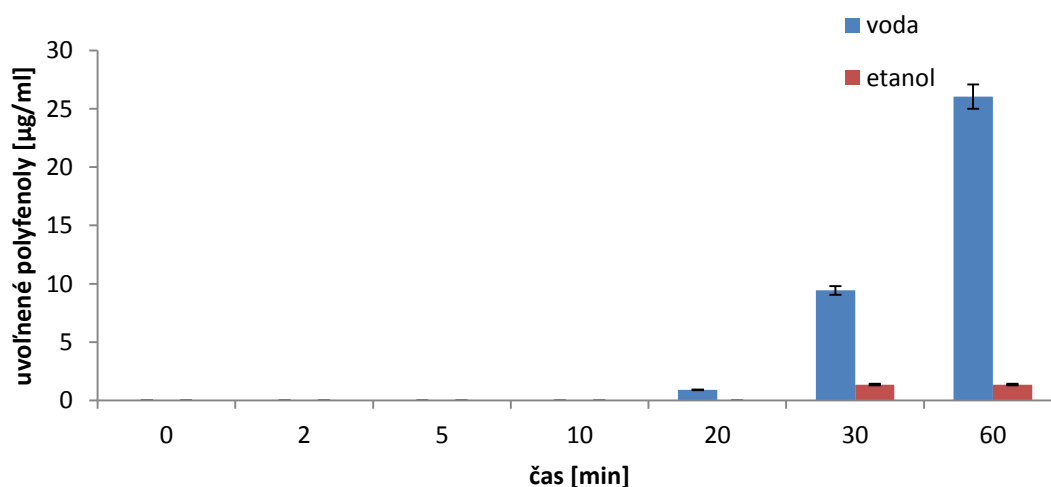
Antioxidačná aktivita neupravených vlákien a vlákien prepláchnutých vodou bola porovnateľná. Vlákna prepláchnuté etanolom mali nižšiu antioxidačnú aktivitu, pretože došlo k uvoľneniu určitého množstva aktívnych látok do etanolu pri preplachovaní vlákien. Rýchlosť uvoľňovania aktívnych látok z testovaných vlákien do rôznych prostredí bola ďalej sledovaná v nasledujúcich kapitolách.

### 5.5.2 Krátkodobá stabilita vlákien

Krátkodobá stabilita vlákien bola skúmaná pracovným postupom popísaným v bode 4.18.

#### 5.5.2.1 Uvoľňovanie polyfenolov

Nasledujúci graf zobrazuje uvoľňovanie polyfenolov z 1 cm<sup>2</sup> vlákna obsahujúceho lipidový extrakt z dubovej kôry.

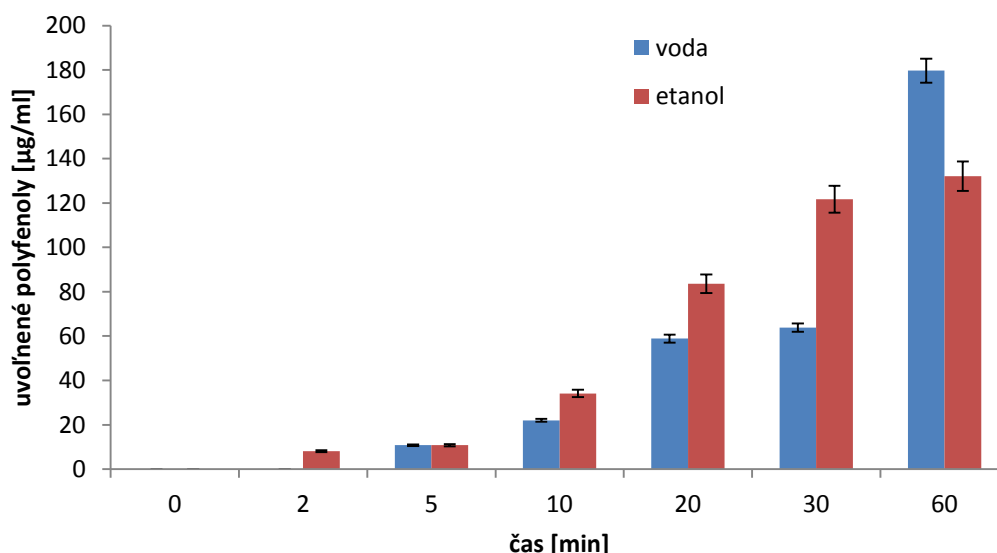


Obrázok 40: Dubová kôra



Je možné vidieť, že polyfenoly sa rýchlejšie uvoľňovali do vody a toto uvoľňovanie nastalo v čase 20 minút. Do etanolu sa polyfenoly začali uvoľňovať až v čase 30 minút a vo výrazne nižšej miere, než do vody a po ďalšej pol hodine nebol pozorovaný žiadny rozdiel.

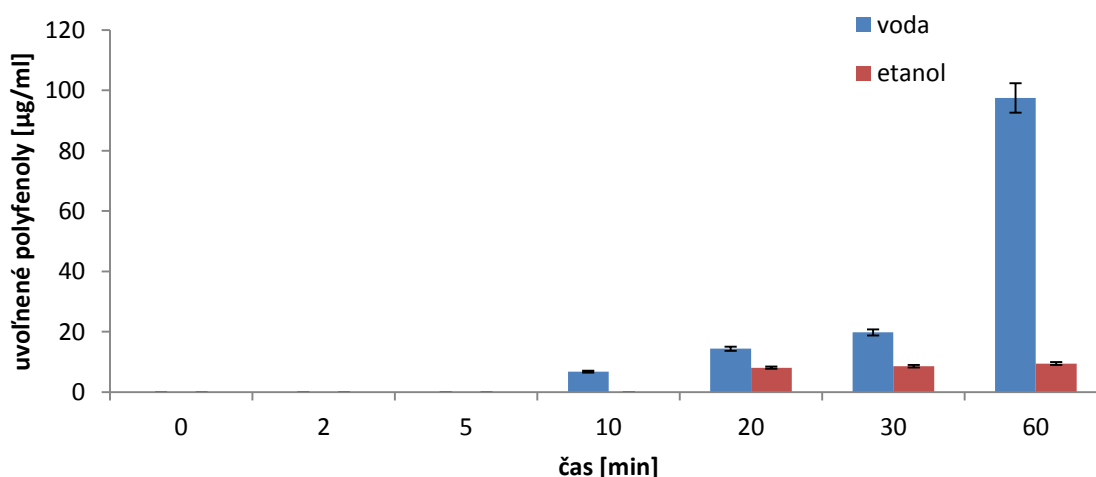
Nasledujúci graf zobrazuje uvoľňovanie polyfenolov z 1 cm<sup>2</sup> vlákna obsahujúceho lipidový extrakt z klinčeka.



Obrázok 41: Klinček

U extraktu z klinčeka bolo zaznamenané uvoľnenie do etanolu už po dvoch minútach a do vody po 5 minútach. Po uplynutí 1 hodiny bolo pozorované vyššie množstvo uvoľnených polyfenolov do vody, ako do etanolu, kde sa polyfenoly uvoľňovali pozvolnejšie.

Nasledujúci graf (Obrázok 42) zobrazuje uvoľňovanie polyfenolov z 1 cm<sup>2</sup> vlákna obsahujúceho lipidový extrakt zo škorice.

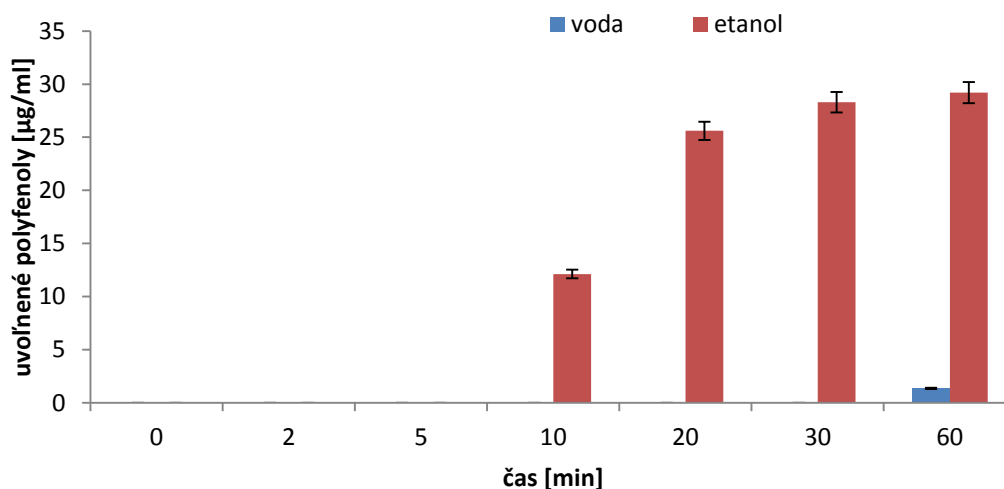


Obrázok 42: Škorica

Podobne ako u predošlých extraktov, viac polyfenolov sa uvoľnilo do vody, kde boli prvé polyfenoly zaznamenané v čase 10 minút a ich množstvo sa v priebehu času výrazne zvýšilo.

Do ethanolu sa po hodine uvoľnilo množstvo porovnateľné množstvu uvoľnenému do vody po 10 minútach.

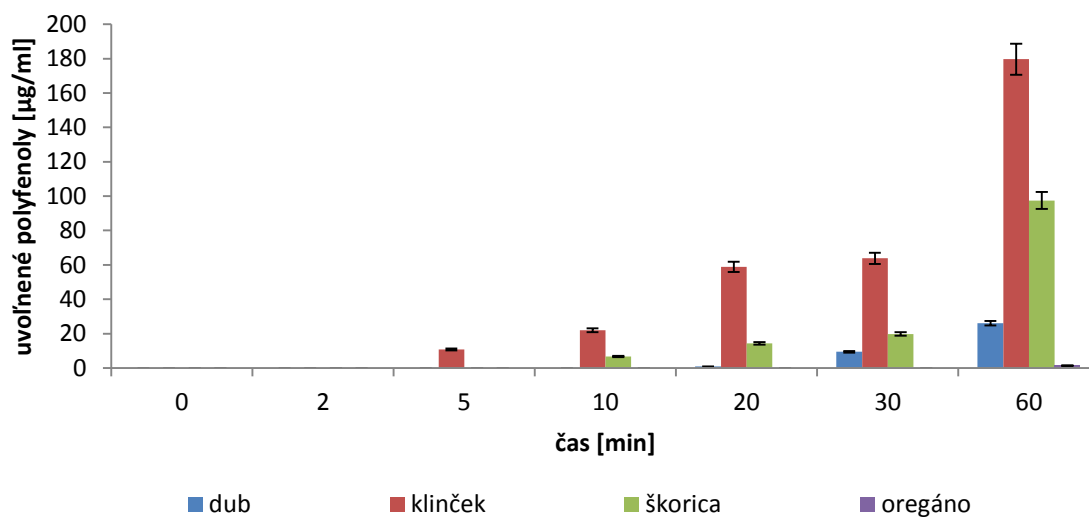
Nasledujúci graf zobrazuje uvoľňovanie polyfenolov z 1 cm<sup>2</sup> vlákna obsahujúceho lipidový extrakt z oregana.



Obrázok 43: Oregáno

Na rozdiel od predošlých vzoriek, výrazne viac polyfenolov sa po hodine uvoľnilo do ethanolu a do vody len zanedbateľné množstvo.

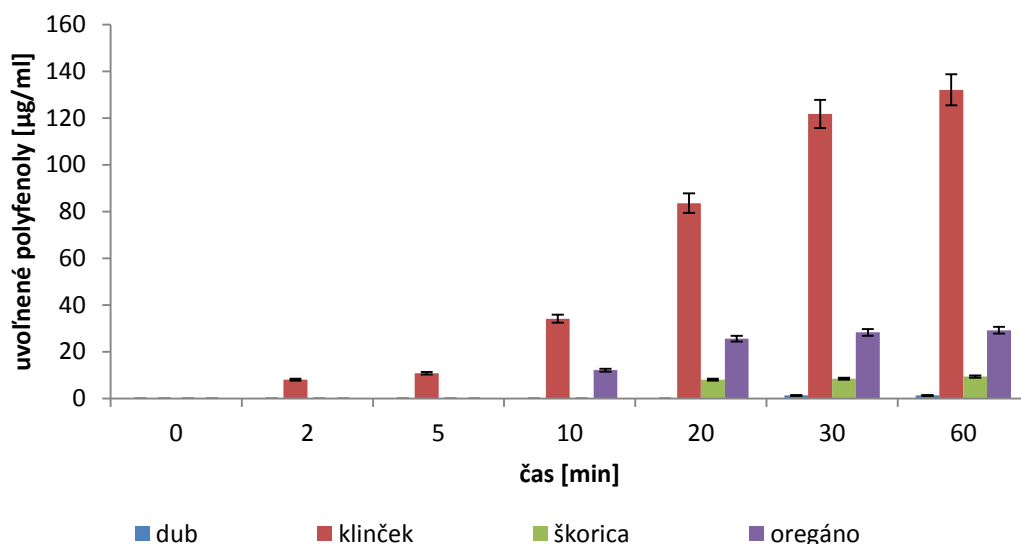
Nasledujúci graf umožňuje porovnanie uvoľňovania polyfenolov z jednotlivých vzoriek do vody.



Obrázok 44: Uvoľňovanie polyfenolov do vody

Z grafu je viditeľné, že výrazne najviac polyfenolov sa do vody uvoľnilo z klinčekových vlákien, nasleduje škorica, dubová kôra a oregáno. Pri porovnaní oregana z ostatnými vzorkami je množstvo uvoľnených polyfenolov po uplynutí 1 hodiny zanedbateľné a je možné konštatovať, že sa do vody polyfenoly z oreganových PHB vlákien za daný časový úsek neuvoľňujú.

Nasledujúci graf (Obrázok 45) porovnáva uvoľňovanie polyfenolov z jednotlivých typov vlákien do ethanolu.

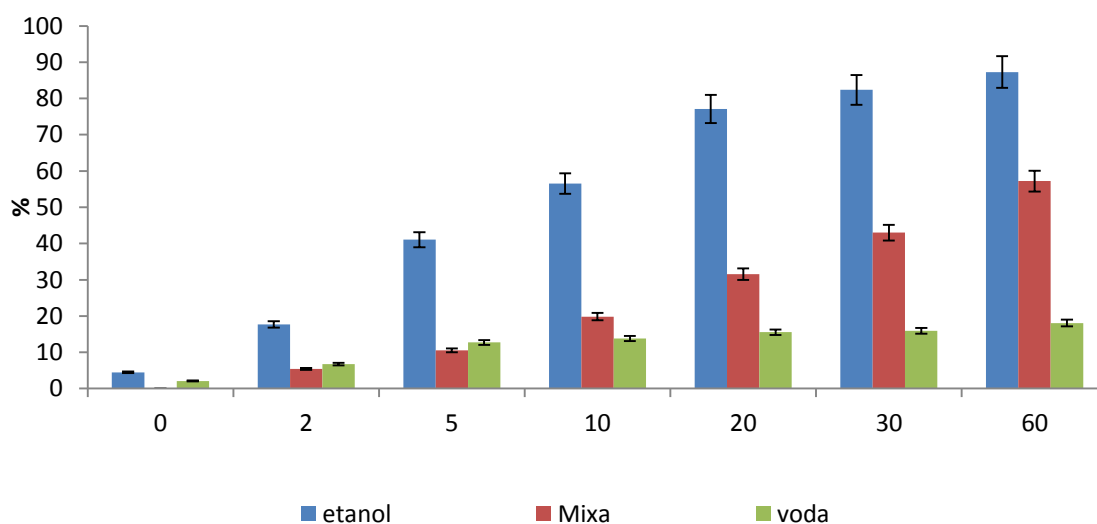


Obrázok 45: Uvoľňovanie polyfenolov do etanolu

Opäť najviac uvoľnených polyfenolov bolo zaznamenaných u klinčekových vlákien, nasleduje oregano, škorica a napokon dubová kôra. Množstvo uvoľnených polyfenolov z dubovej kôry je oproti ostatným vzorkám zanedbateľné, teda sa v danom čase do etanolu neuvoľňujú.

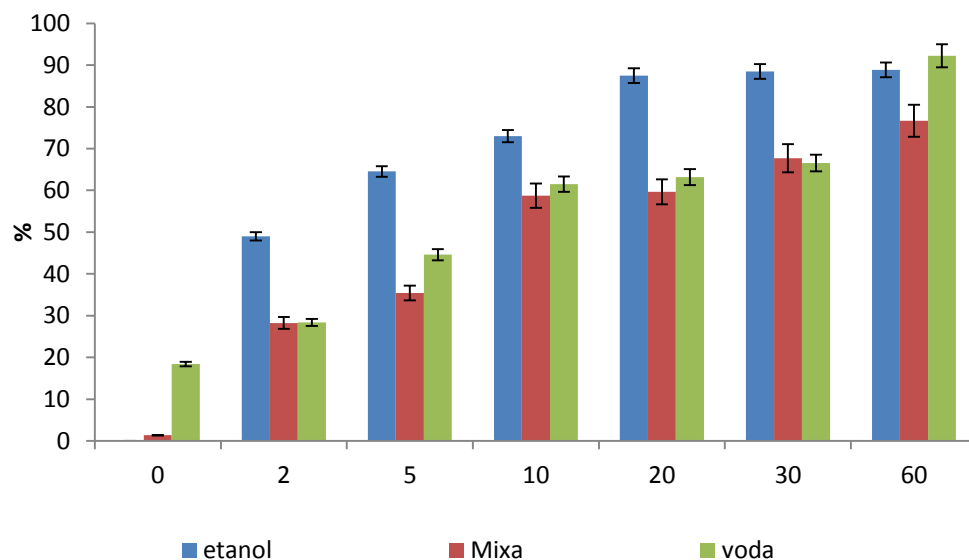
#### 5.5.2.2 Uvoľňovanie ďalších aktívnych látok

V práci bolo študované i uvoľňovanie rôznych aktívnych látok na základe merania absorbancie. Pracovný postup tohto stanovenia je popísaný v bode 4.18. Boli zistené absorpčné maximá jednotlivých vzoriek pomocou merania absorpčného spektra pred a po 24 hodinách v prítomnosti 1cm<sup>2</sup> vlákien v danom prostredí. Nasledujúce grafy zobrazujú množstvo uvoľnených aktívnych látok vyjadrených v percentách.



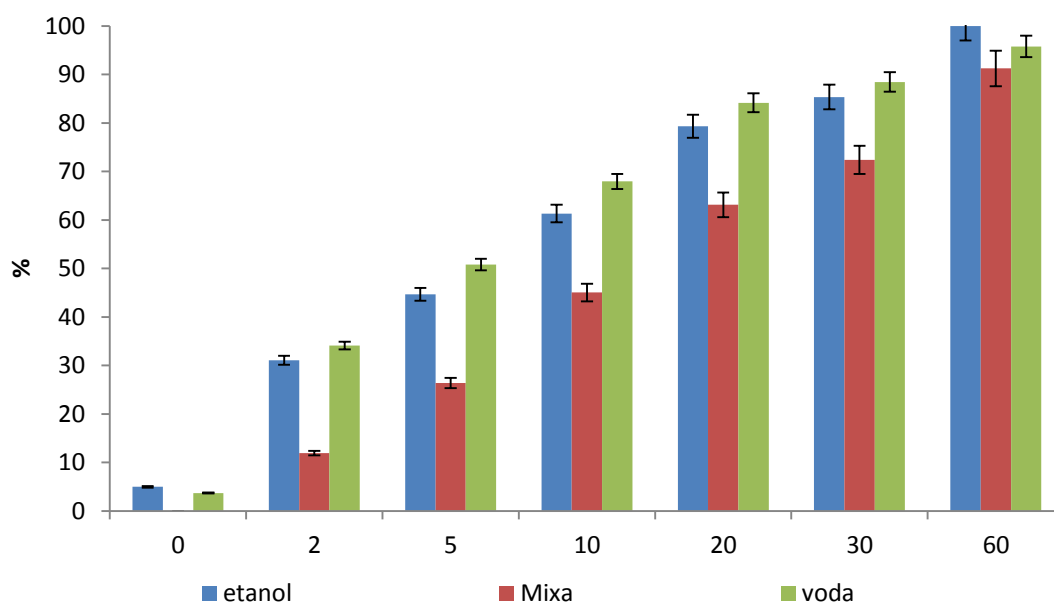
Obrázok 46: Dubová kôra

Najviac aktívnych látok bolo uvoľnených do prostredia etanolu, k uvoľňovaniu došlo hneď po pridaní vlákien do prostredia a celkovo sa za 60 minút uvoľnilo 87,28 % z maxima po 24 hodinách. Najmenej a pomaly sa látky uvoľňovali do vody, po 1 hodine 18,07 %. Do micelárnej vody Mixa došlo po 1 hodine k uvoľneniu 57,2 % látok.



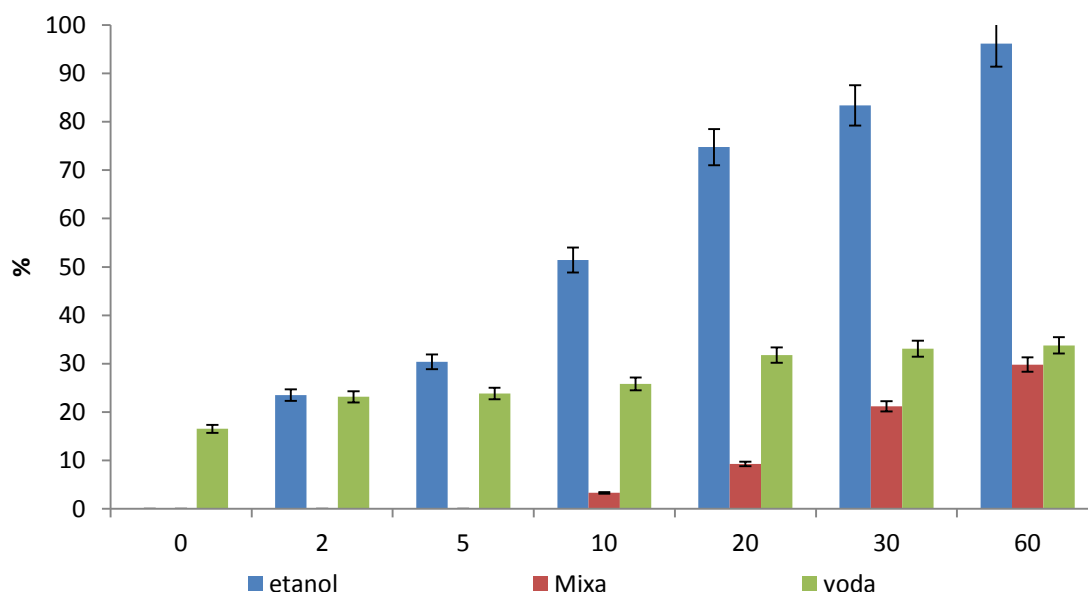
Obrázok 47: Klinček

U vlákien s obsahom extraktu z klinčeka došlo k celkom rýchlemu uvoľňovaniu aktívnych látok, a to približne 90 % do vody a etanolu a 76 % do Mixy. Opäť sa najvyššia koncentrácia zložiek uvoľnilo do etanolu, až v čase 60 minút tieto hodnoty dobehli látky uvoľnené do vody.



Obrázok 48: Škorica

Hodnoty namerané u PHB vlákien obsahujúcich extrakt zo škorice boli podobné, ako v predošlom prípade. To môže byť spôsobené tým, že aj škorica aj klinček obsahujú vysoké množstvo eugenolu, preto je pozorované podobné chovanie sa v modelových prostrediach.



Obrázok 49: Oregano

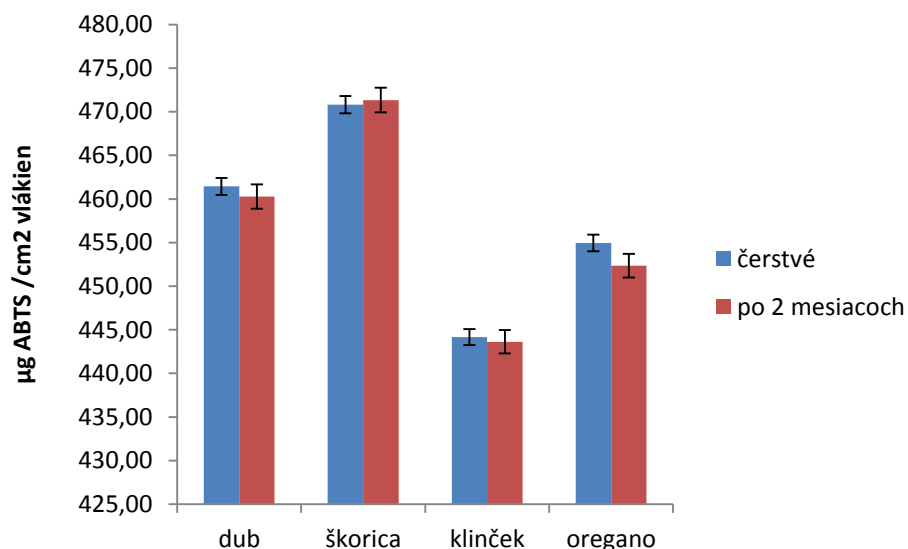
U vlákien obsahujúcich oregano sa potvrdilo chovanie aktívnych látok, ktoré bolo popísané pri stanovovaní uvoľňovania polyfenolov - najrýchlejšie sa aktívne látky uvoľňovali do etanolu, a to až 96,18 % z maxima po jednej hodine. Najmenšie množstvo zložiek sa v priebehu prvej hodiny uvoľnilo do Mixa micelárnej vody, a to 29,8 %.

Záverom je teda možné konštatovať, že u etanolu došlo k uvoľňovaniu aktívnych látok pri všetkých typoch pozorovaných vlákien. Najvyššie hodnoty boli namerané u vlákien obsahujúcich škoricový extrakt, najnižšie hodnoty dosiahol klinček. do Mixa micelárnej vody sa výrazne najviac uvoľňovali aktívne látky zo škoricových vlákien. Naopak u oregana nedošlo takmer k žiadnemu uvoľneniu zložiek. Aj v prípade vody sa výrazne najvyššia koncentrácia aktívnych látok uvoľnila práve zo škoricových vlákien. Klinček a dubová kôra dosiahli približne porovnateľné hodnoty. Oregano je opäť zanedbateľné, k uvoľňovaniu takmer nedochádza.

Na základe vyššie uvedeného testovania je možné tvrdiť, že aktívne látky sa z pripravených vlákien uvoľňujú postupne v priebehu času. Aktívne zložky by teda pri praktickom použití pôsobili postupne a tým by sa predĺžila doba ich priaznivého pôsobenia. Najrýchlejšie by sa na ľudskú pokožku uvoľňovali aktívne látky zo škoricových vlákien, ak vezmeme do úvahy ako modelové prostredie micelárnu vodu Mixa, pri ktorej výrobca uvádza, že má zloženie a pH kompatibilné s ľudskou pokožkou. Ak by bolo požadované dlhodobé postupné pôsobenie, boli by vhodnejšie vlákna obsahujúce extrakt z dubovej kôry, pri ktorých sa v priebehu hodiny uvoľnilo 60 % aktívnych zložiek.

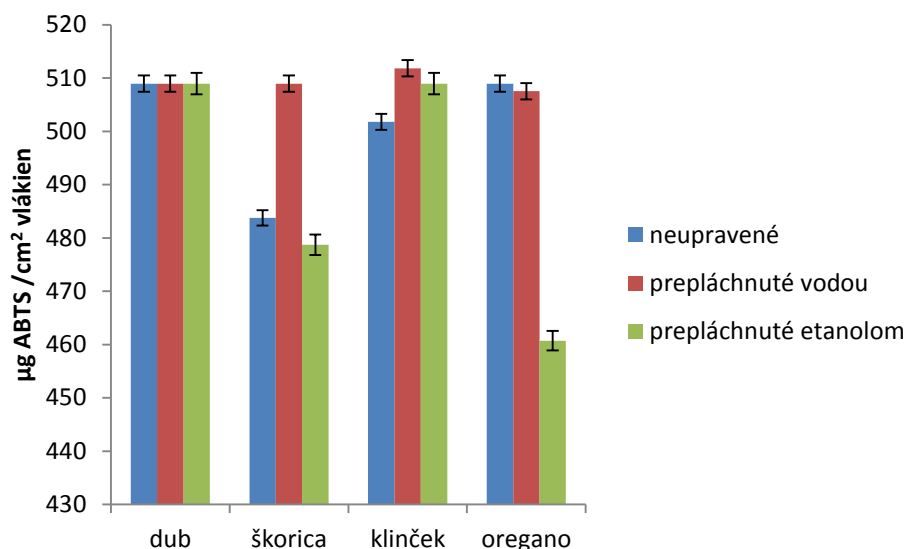
## 5.6 Dlhodobá stabilita vlákien

Dlhodobá stabilita vlákien bola testovaná pomocou stanovenia antioxidačnej aktivity, postup je popísaný v bode 4.17. Vlákna boli uchovávané pri laboratórnej teplote v Petriho miske v tme. Dlhodobá stabilita bola stanovovaná 2 mesiace po príprave vlákien. Porovnanie antioxidačnej aktivity neupravených vlákien po príprave a po dlhodobom skladovaní je zobrazené na nasledujúcom obrázku.



Obrázok 50: Porovnanie antioxidačnej aktivity vlákien po príprave a po dlhodobom skladovaní

Vlákná po dlhodobom skladovaní majú porovnateľnú antioxidačnú aktivitu s vláknami po príprave. Ďalej boli testované vlákna po vystavení modelovým prostrediam ako v prípade stanovenia vlákien po príprave, ktoré je uvedené v bode 4.17.

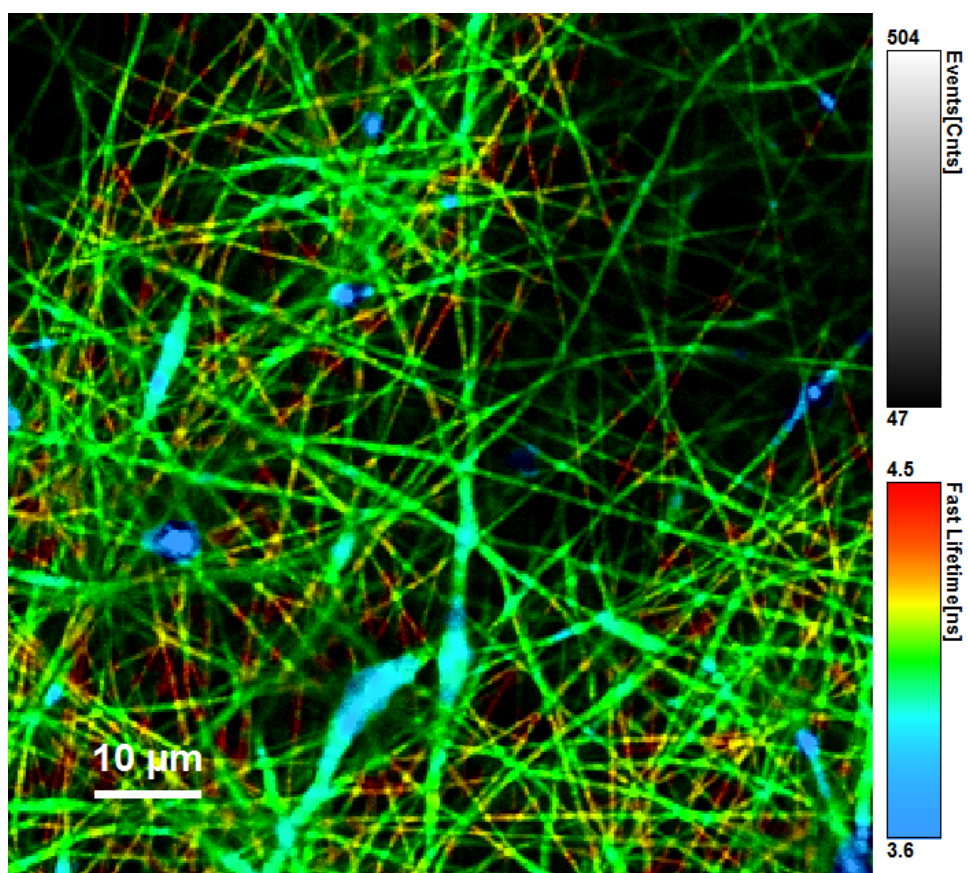


Obrázok 51: Antioxidačná aktivita vlákien po dlhodobom uchovávaní

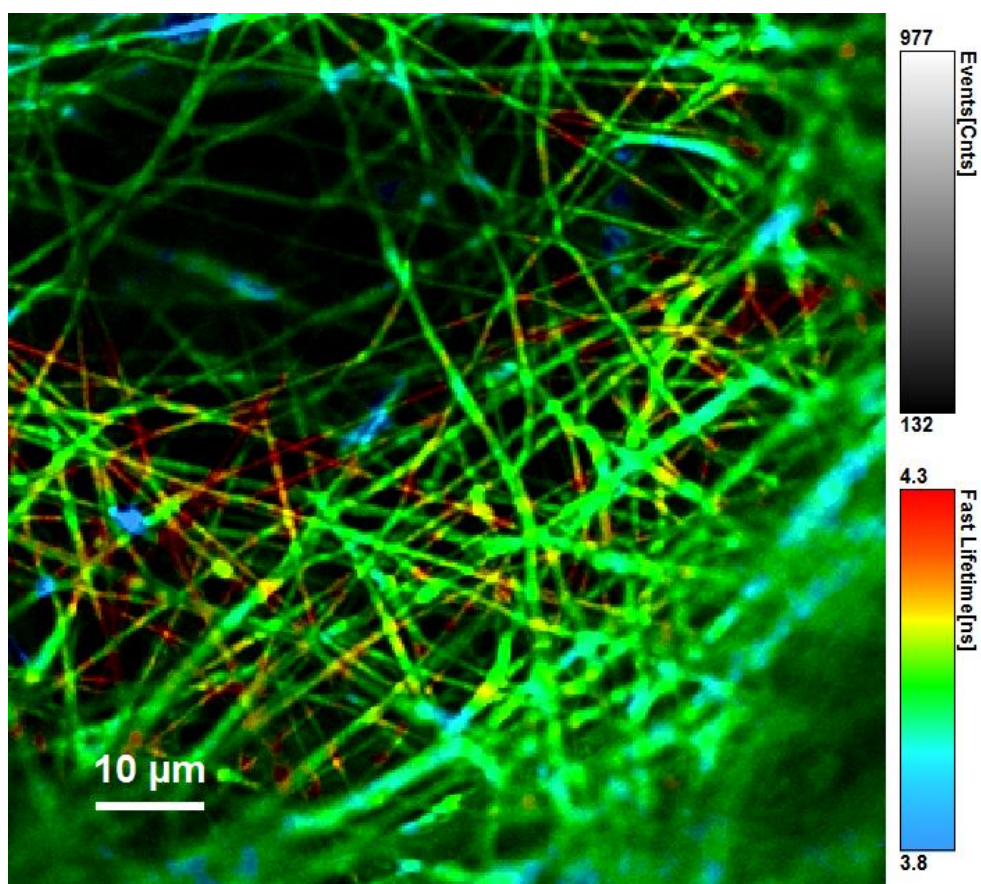
Všetky testované vlákna vykazovali antioxidačnú aktivitu porovnateľnú s antioxidačnou aktivitou po príprave vlákien. Mierna odchýlka nastala u oreganových vlákien preplachovaných v etanole, ktorá môže znamenať zníženie stability práve v etanole rozpustných zložiek (k ich uvoľneniu do etanolu došlo rýchlejšie, ako pri testovaní antioxidačnej aktivity vlákien po ich príprave). Každopádne je ale možné zhodnotiť, že dané podmienky – laboratórna teplota a uchovávanie v suchom stave v tme- sú vhodnými podmienkami pre dlhodobé skladovanie PHB vlákien obsahujúcich lipidové extrakty.

### 5.6.1 FLIM analýza vlákien

Vlákná boli podrobené FLIM analýze, ktorá je popísaná v bode 4.20. Pre túto analýzu boli pripravené vlákna, ktoré boli počas zvlákňovania pomocou elektrospinningu ofarbené pomocou Nílskej červene.



Obrázok 52: Vlákna PHB obsahujúce klinčekový extrakt ofarbené NR



Obrázok 53: Vlákna PHB bez extraktu ofarbené NR

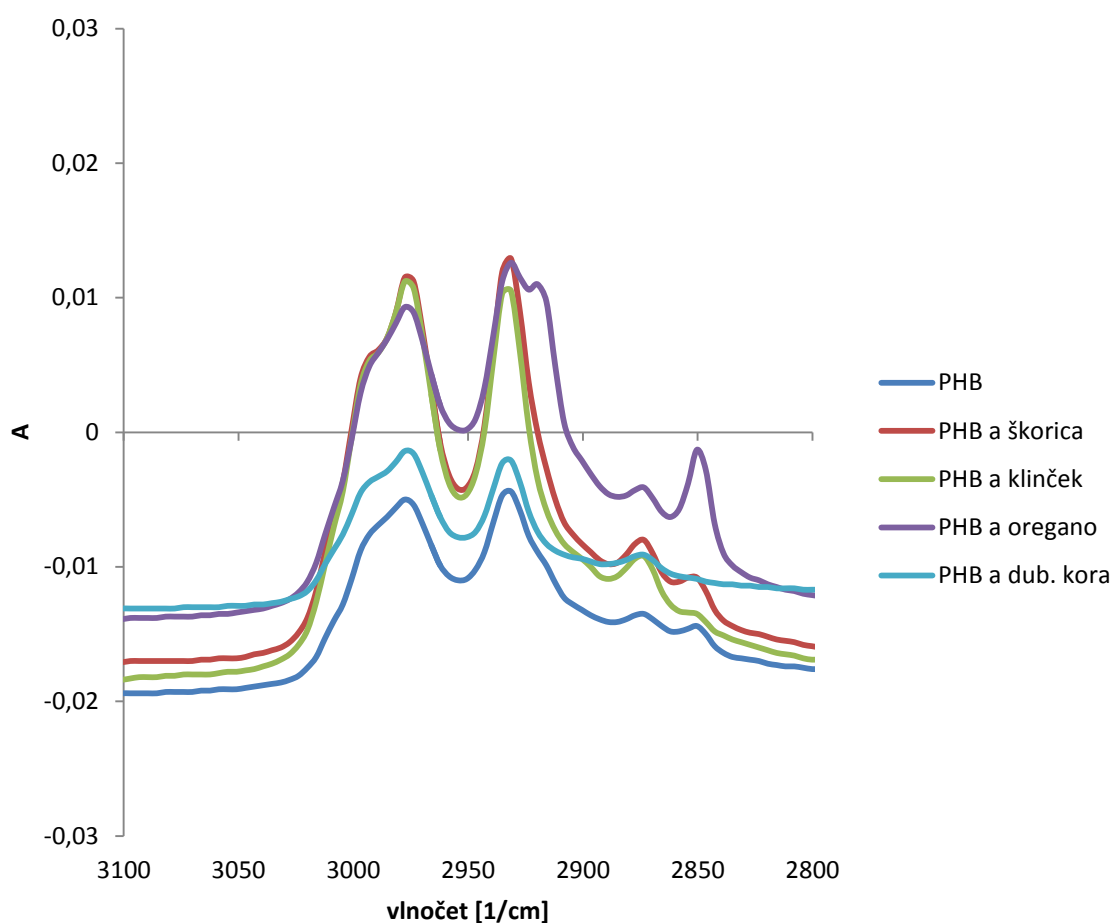


Z obrázkov (Obrázok 52 a Obrázok 53) je viditeľné, že pripravené vlákna majú rôznorodú hrúbku pohybujúcu sa približne desatinách až jednotkách mikrometrov. Vlákna sú navrstvené tak, že veľkosť pórov dosahuje nanometrové rozmery a je teda možné tvrdiť, že pripravené vlákna sú schopné odfiltrovať prípadnú bakteriálnu alebo kvasinkovú kontamináciu.

Doby života jednotlivých miest na PHB vláknach sú rôzne, napriek tomu bol zaznamenaný rozdiel vlákien s obsahom olejových extraktov, ktoré svietili intenzívnejšie. Preto je možné predpokladať, že olejové extrakty boli do vlákien úspešne enkapsulované. Prítomnosť olejových extraktov v testovaných vláknach bola potvrdená analýzou vlákien bez ofarbenia, opäť pri porovnaní s vláknami bez prídavku oleja. Výsledky sú uvedené v prílohe 9.2.

## 5.7 FTIR ATR

Boli testované vlákna obsahujúce lipidové extrakty. Výsledky testovaných vzorkov vlákien s obsahom lipidových extraktov boli porovnané s vláknami bez ich prídavku. Nasledujúci graf zobrazuje porovnanie týchto vzorkov v oblasti, kde boli pozorované rozdiely.



Obrázok 54: Porovnanie vlákien obsahujúcich lipidové extrakty s čistými vláknami PHB

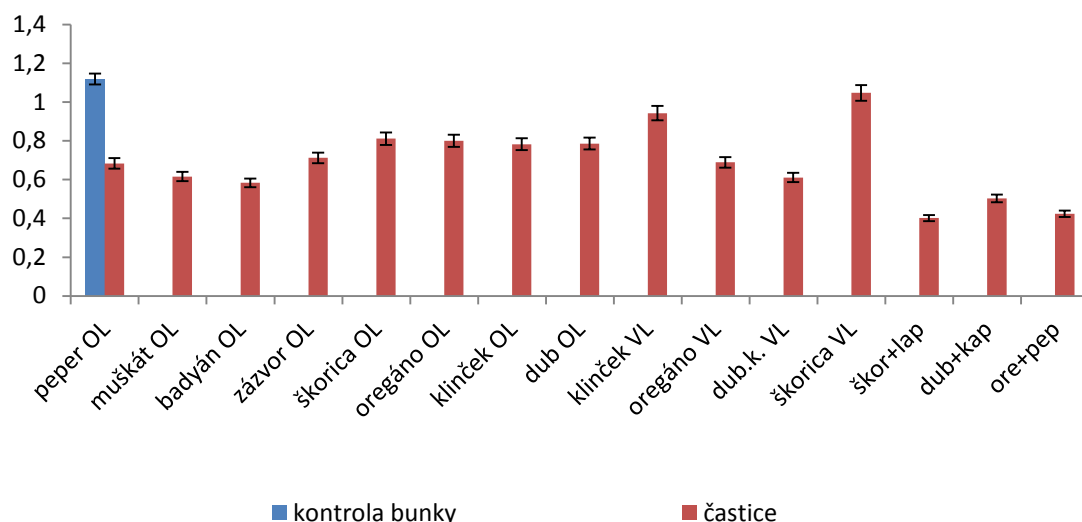
Hlavný rozdiel, ktorý bol u vzorkov zaznamenaný, bol pík na pozícii  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Tento pík, ktorý vyjadruje prítomnosť aldehydov, bol zaznamenaný len u vlákien s obsahom olejových extraktov. Najvyšší pík bol zaznamenaný u extraktu z oregana. Aldehydy sú hlavné zložky rastlinných silíc, izolované olejové extrakty sú teda bohaté na ich obsah. Naopak samotné PHB vlákna aldehydy neobsahujú. Z dosiahnutých výsledkov je teda možné skonštatovať, že bola preukázaná prítomnosť olejových extraktov v testovaných vláknach.



## 5.8 Antimykotické testy pripravených častíc a vlákien

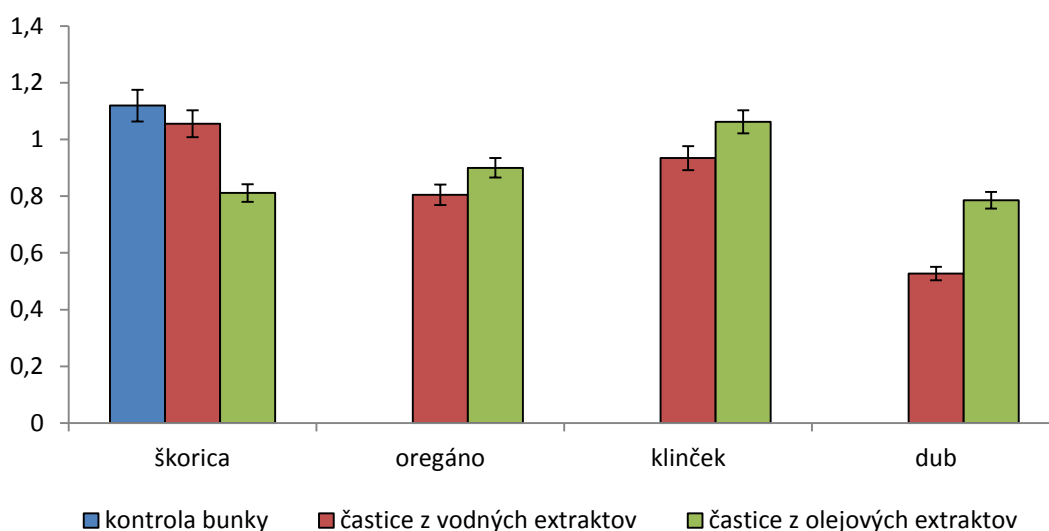
### 5.8.1 Antimykotické testy častíc

Antimykotická aktivita častíc bola prevedená podľa pracovného postupu popísaného v bode 5.8.1.



Obrázok 55: Antimykotické pôsobenie častíc

U všetkých typov lipozómov bola zaznamenaná schopnosť inhibície rastu kvasiniek. Najlepší antimykotický účinok bol zaznamenaný u kombinovaných lipozómov. Kombinácia vodného a lipidového extraktu teda dopomohla k lepšej schopnosti inhibície rastu kvasiniek. Kombinované lipozómy obsahovali extrakty zo škoric a lapacha, dubu a kapucinky a oregana s peprom.

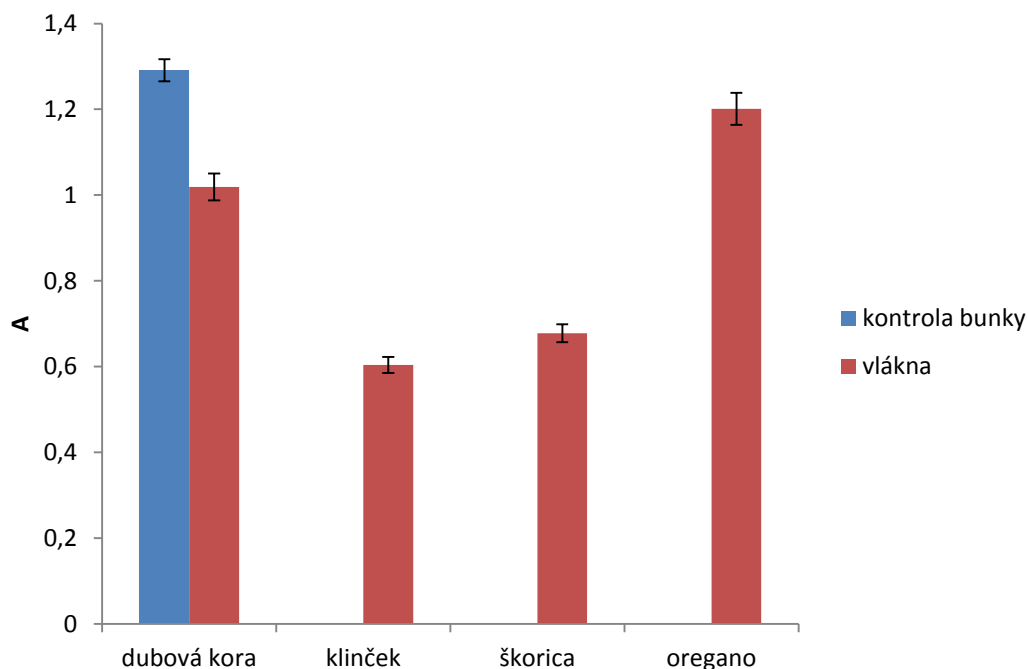


Obrázok 56: Antimykotické pôsobenie lipozómov s obsahom PHB

Všetky testované lipozómy s obsahom PHB vykazovali čiastočnú antimykotickú aktivitu. S výnimkou škoric vykazovali všetky lipozómy lepšiu inhibičnú schopnosť v prípade vodných extraktov. Vodné extrakty prestupujú do tekutého média lepšie než lipidové, preto mohli intenzívnejšie pôsobiť. Prídavok PHB nemá výrazný vplyv na antimykotické pôsobenie častíc.

### 5.8.2 Antimykotické testy vlákien

Antimykotická aktivita vlákien bola prevedená podľa precovného postupu popísaného v bode 4.23.1.

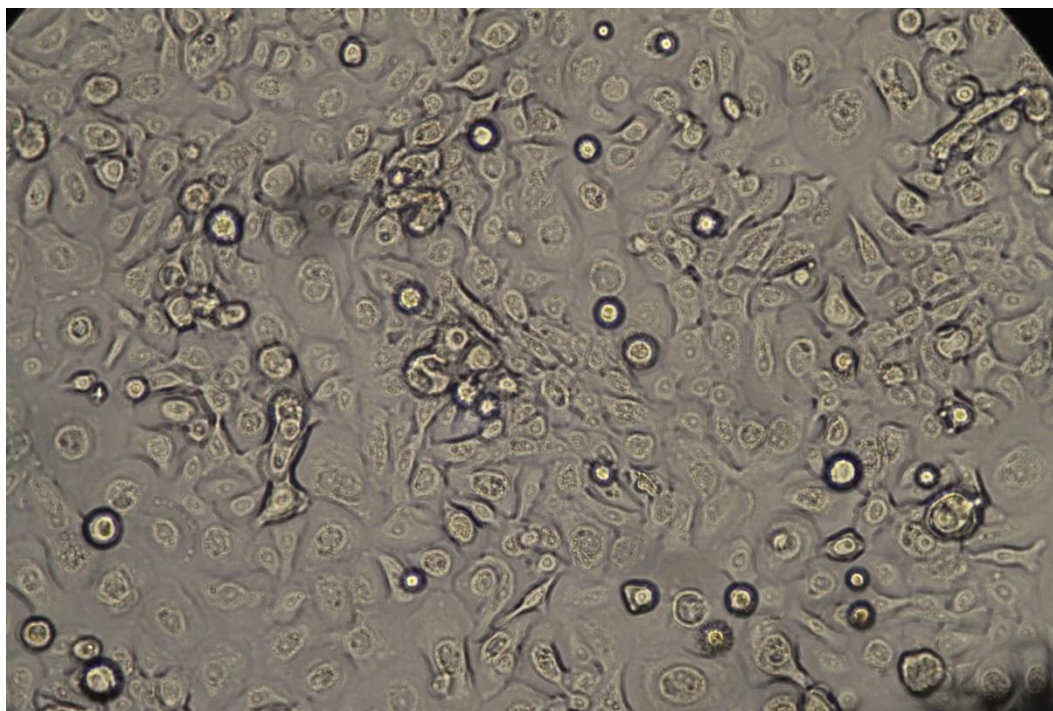


Obrázok 57: Antimykotická aktivita vlákien

Čiastočný antimykotický účinok z testovaných vlákien vykazovali vlákna s extraktom z dubovej kôry. Najvyšší inhibičný účinok bol však pozorovaný v prípade vlákien s obsahom extraktu z klinčeka a zo škoric.

### 5.9 MTT testy cytotoxicity na keratinocytoch

Pracovný postup MTT testu je popísaný v bode 4.24.2. Pre tento test boli vyrobené lipozómy obsahujúce lipidový extrakt škoric a klinčeka z dôvodu dobrých antimykotických účinkov, antioxidačnej aktivity, obsahu polyfenolov a flavonoidov. Tieto lipidové extrakty boli použité aj pre prípravu PHB vlákien a je teda možné predpokladať ich rovnakú cytotoxicitu aj pri použití pre túto aplikáciu.



Obrázok 58: Ľudské keratinocyty, zväčšenie 200x

### 5.9.1 Test lipozómov

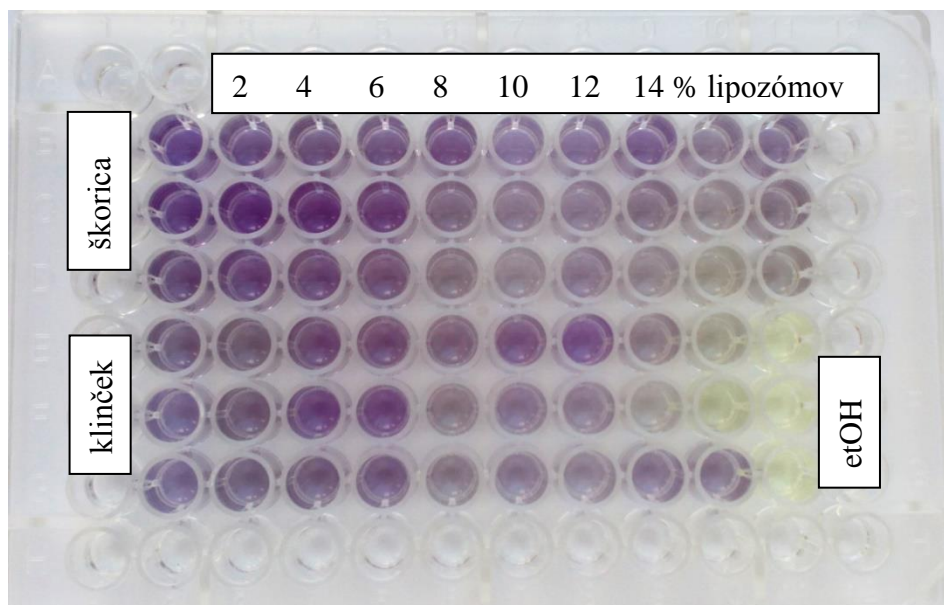
Množstvo lecitínu v lipozómoch obsahujúcich lipidový extrakt škorice a klinčeku bolo stanovené Stewartovou metódou popísanou v bode 4.24.3 a je uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 7: Množstvo lecitínu v jednotlivých jamkách MTT testu

vzorka	% roztok lipozómov	množstvo lecitínu [ $\mu\text{g}$ ]	obsah enkapsulovaných polyfenolov [ $\mu\text{g}$ ]
škorica	2	33,17	28,48
	4	66,34	56,95
	6	99,51	85,43
	8	132,67	113,90
	10	165,84	142,38
	12	199,01	170,86
	14	232,18	199,33
klinček	2	26,15	24,27
	4	52,31	48,54
	6	78,46	72,82
	8	104,62	97,09
	10	130,77	121,36
	12	156,93	145,63
	14	183,08	169,90

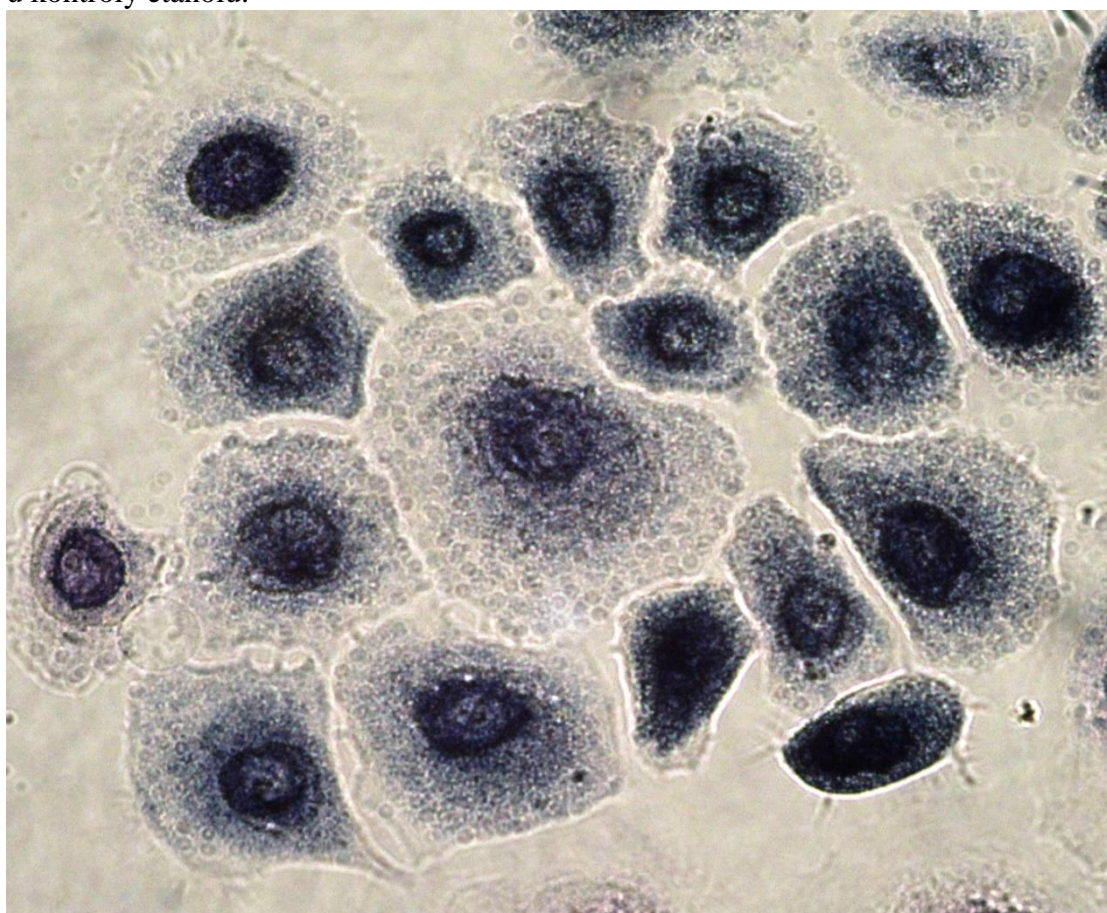
Množstvo lecitínu v jednotlivých jamkách doštičky sa u škoricových lipozómov pohybovalo od 33,17 do 232,18  $\mu\text{g}$ . U klinčekových lipozómov bolo namerané menšie množství lecitínu pri daných koncentráciách častíc, a to od 26,15 do 183,08  $\mu\text{g}$ .





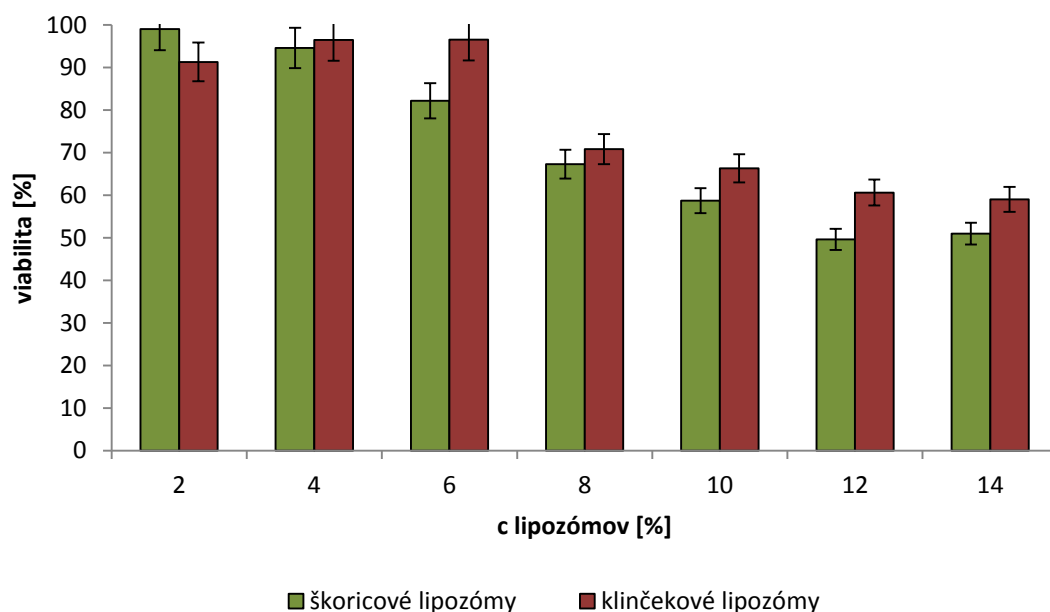
Obrázok 59: MTT test lipozómov

Z obrázku je viditeľné, že lipozómy nemali cytotoxický účinok na keratinocyty. Žlté MTT sa mitochondriálnymi enzýmami dýchacieho reťazca redukovalo na fialový formazanový derivát, ktorý zostával vo vnútri buniek vo forme nerozpustných granúl (Obrázok 60). Po pridaní detergentu (SDS) a okyslení sa farbivo z buniek uvoľnilo a rozpustilo, takže vznikol číry fialový roztok vhodný k fotometrickému stanoveniu. Žlté MTT bolo pozorované len u kontroly etanolu.



Obrázok 60: Nerozpustné granule formazanového derivátu MTT v keratinocytoch (zväčšenie 400x)

Nasledujúci graf zobrazuje intenzity fialového roztoku rozpustených formazánových kryštálov vyjadrujúci množstvo živých buniek blanku v porovnaní s intenzitou tohto roztoku v závislosti na množstve pridaných lipozómov ku keratinocyto. Meranie bolo prevedené tri krát a graf zobrazuje priemernú hodnotu z týchto meraní.

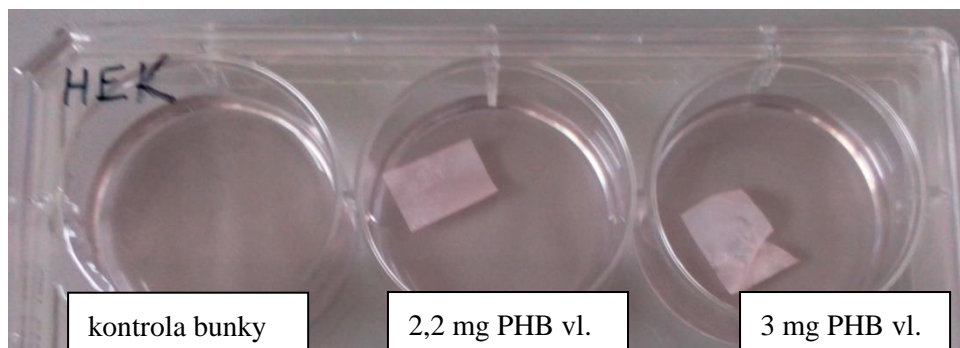


Obrázok 61: Test cytotoxicity lipozómov

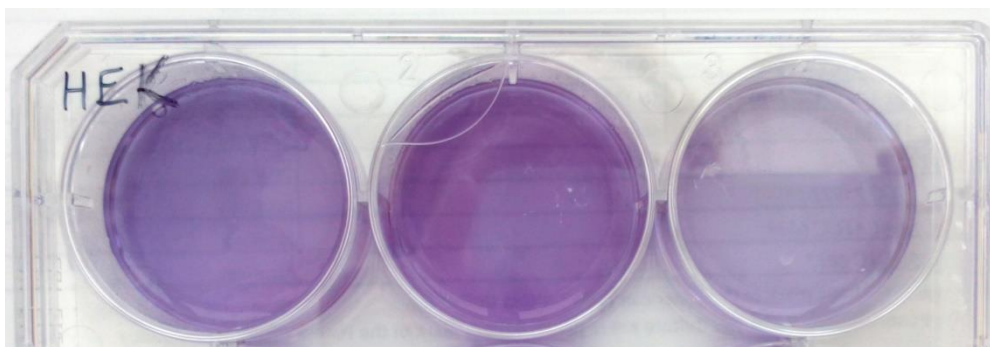
Bola pozorovaná závislosť koncentrácie lipozómov na množstve živých buniek. Čím viac lipozómov bolo prítomných, tým viac sa znižovala viabilita buniek (Obrázok 61). Za hranicu cytotoxicity je považovaných 60% prežitých buniek oproti blanku. Táto podmienka je splnená u škoricových lipozómov do koncentrácie 8% a u klinčekových lipozómov do koncentrácie 12 %. Tieto koncentrácie sú teda hraničné pre cytotoxické pôsobenie daných častíc. Ďalšie typy extraktov a častíc boli testované v súbežnej bakalárskej práci Michaely Ručkovej.

### 5.9.2 Test PHB vlákien

Do jamiek 6-jamkovej doštičky boli pridané 2 kúsky sterilných PHB vlákien s hmotnosťou 2,2 a 3 mg. Proces MTT testu je zobrazený na nasledujúcich obrázkoch.

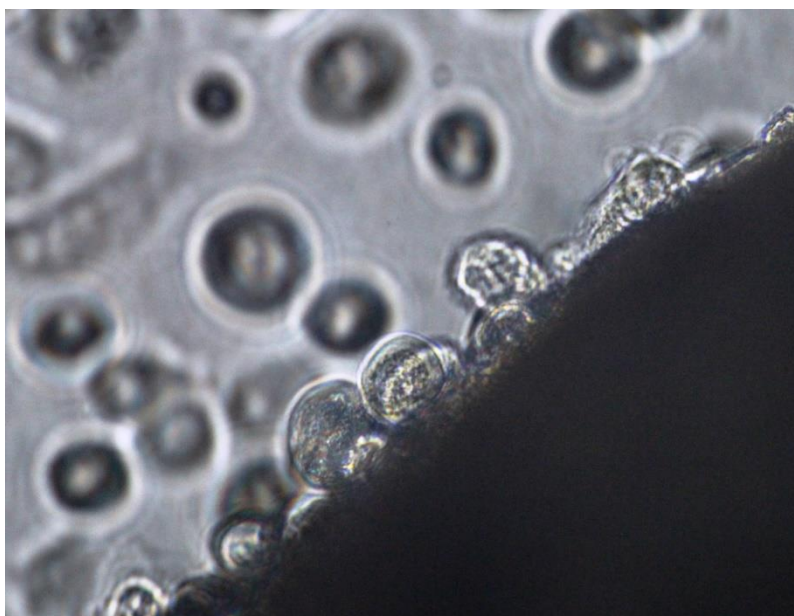


Obrázok 62: Jamky s bunkami, médiom a skúmanými vláknami pred pridaním MTT



*Obrázok 63: MTT test vlákien*

Bola stanovená absorbancia jednotlivých formazánových roztokov. Pri porovnaní s blankom bolo zistené, že v prítomnosti 2 mg vlákna PHB narástlo 83,58 % buniek a v prítomnosti 3 mg vlákna PHB narástlo 62,72 % buniek. Je teda možné konštatovať, že dané množstvo PHB vlákien nepôsobilo na keratinocyty cytotoxicky.



*Obrázok 64: Keratinocyty zachytené na PHB vlákne, zväčšenie 400x*

Z prevedného testovania je teda možné konštatovať, že pripravené vzorky je možné v danom množstve použiť na ľudskú pokožku bez negatívnych cytotoxických efektov. Enkapsulované aktívne látky pôsobia antimykoticky a antioxidačne a k ich uvoľňovaniu dochádza postupne v priebehu niekoľkých hodín. Postupným uvoľňovaním je predĺžený priaznivý účinok aktívnych zložiek.



## 6 ZÁVER

Predložená diplomová práca bola zameraná na prípravu nových materiálov s antimikrobiálnym účinkom. V práci boli pripravené nanočastice i nanovlákná s obsahom bylinných a koreniových extraktov z kozinca, badyánu, klinčeka, oregana, zázvoru, škorice, pepru, lapacha, kapucínky, dubovej kôry, pomarančovej kôry a muškátového oriešku. Tieto vzorky boli najprv charakterizované a následne boli vybrané extrakty použité k enkapsulácii. Taktiež bola testovaná možnosť enkapsulácie klotrimazolu.

U všetkých použitých antimikrobiálnych zložiek bola sledovaná ich antimykotická aktivita pred a po enkapsulácii do rôznych typov častíc a vlákien. Taktiež bol sledovaný obsah celkových polyfenolov a flavonoidov, antioxidačná aktivita a u lipidových extraktov obsah mastných kyselín metódou GC/FID.

Najvyšší obsah polyfenolov bol zaznamenaný u vodných extraktov z oregana, dubovej kôry a u lipidových extraktov z klinčeka a škorice. Najviac flavonoidov obsahovali vodné extrakty z oregana a dubovej kôry. U lipidových extraktov to boli klinček, zázvor a lapacho. Čo sa týka antioxidačnej aktivity, najlepší účinok dosiahli vodné extrakty z oregana a škorice a lipidové extrakty z lapacha a dubovej kôry. Antimykotický účinok bol zaznamenaný u všetkých extraktov. Najvyššia schopnosť inhibovať rast kvasinkových buniek bola zaznamenaná u vodného extraktu zo zázvoru, dubovej kôry, oregana a pepru. U lipidových extraktov bol účinok najvyššia u klinčeka, škorice, oregana a pepru.

Vybrané vodné a lipidové extrakty boli enkapsulované do lipozómov a lipozómov s obsahom PHB. Celkovo bolo pripravených 29 typov častíc. Bola charakterizovaná ich veľkosť pomocou dynamického rozptylu svetla, stabilita pomocou zeta potenciálu, enkapsulačná účinnosť a krátkodobá i dlhodobá stabilita. Veľkosť lipozómov sa pohybovala v rozmedzí od 165 do 329 nm. Lipozómy s prídavkom PHB boli o niečo väčšie. Z hľadiska koloidnej stability, stanovenej pomocou zeta potenciálu, boli všetky typy pripravených častíc stabilné, prídavek PHB mal navyše na stabilitu pozitívny vplyv. Enkapsulačná účinnosť bola nižšia u vodných extraktov ako lipidových extraktov. Lipidové extrakty sa teda enkapsulovali účinnejšie, a to od 72% do 82%. Boli skúmané aj antimykotické účinky častíc na rast kvasinky *Candida glabrata*. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté u kombinovaných lipozómov obsahujúcich vodný extrakt škorice a lipidový extrakt lapacha. Štúdium krátkodobej stability bolo u častíc uskutočnené za účelom zistenia maximálnej rýchlosti uvoľnenia aktívnych látok, v čase 60 minút sa tak do etanolu postupne uvoľní v priemere až 85% enkapsulovaného množstva. Z toho vyplýva, že po aplikácii častíc na ľudskú pokožku sa s najväčšou pravdepodobnosťou budú aktívne látky uvoľňovať postupne v priebehu niekoľkých hodín. Z hľadiska dlhodobej stability boli častice veľmi stabilné a po mesašnom skladovaní vo vodnom prostredí nedošlo k uvoľneniu žiadneho množstva enkapsulovaných polyfenolov.

Ďalšou časťou práce bola príprava nanovláknien z PHB pomocou elektrospinningu a forcespinningu. Celkovo bolo pripravených 37 typov vlákien, ktoré sa navzájom líšili koncentráciou PHB, spôsobom prípravy, koncentráciou klotrimazolu a obsahom lipidových extraktov. Vlákná boli pripravované za účelom štúdia možnosti uvoľňovania aktívnych látok na pokožke a porovnaní ich antioxidačných a antimykotických vlastností, vrátane dlhodobej stability. Z dôvodu vysokého obsahu polyfenolov, flavonoidov, dobrej antioxidačnej a antimykotickej aktivity boli pre prípravu PHB vlákien s obsahom lipidových extraktov zvolené ako najvhodnejšie extrakty škorice, klinčeka, oregana a dubovej kôry.

Prítomnosť týchto extraktov vo vláknach pripravených pomocou elektrospinningu bola dokázaná na základe stanovenia antioxidačnej aktivity. Všetky testované vlákna vykazovali veľmi dobrú antioxidačnú aktivitu, a to aj z dlhodobého hľadiska po dvojmesačnom skladovaní v suchom stave. Najlepšie antimykotické účinky však boli dosiahnuté u vlákien s obsahom klotrimazolu.

Pre potvrdenie úspešnej enkapsulácie vybraných lipidových extraktov do vlákien z PHB boli tieto vlákna podrobené FLIM analýze, pre podrobnejšiu charakterizáciu zabudovania aktívnych látok vo vláknach boli skúmané taktiež metódou FTIR ATR. Krátkodobá stabilita vlákien bola stanovená na základe uvoľňovania polyfenolov a ďalších aktívnych látok do vody, etanolu a Micelárnej vody Mixa s fyziologickým pH pokožky. Polyfenoly a aktívne látky sa uvoľňovali postupne a tým by sa v praktickom použití predĺžila doba ich priaznivého pôsobenia na pokožku.

Na záver bola vykonaná charakterizácia účinku častíc a vlákien na humánne bunky. Presnejšie bola testovaná cytotoxicita na ľudských keratinocytoch HEK (102-105a) pomocou MTT testu. Pre toto testovanie boli vybraté reprezentatívne vzorky lipozómov, ktoré obsahovali lipidový extrakt škorice a klinčeka. Najvyššia možná koncentrácia lipozómov vo finálnom produkte, ktorá by nemala cytotoxické účinky na ľudské keratinocyty, bola stanovená na 8 % u škoricových a 12 % u klinčekových lipozómov. Ďalej boli taktiež testované sterilné PHB vlákna, u ktorých je možné skonštatovať, že v testovanom množstve nemajú cytotoxický účinok na skúmané bunky.

Možným praktickým využitím poznatkov tejto diplomovej práce by mohli byť PHB kryty rán obsahujúce prírodné lipidové extrakty alebo gély s obsahom lipozómov s enkapsulovanou aktívnou zložkou. Ďalší výskum v tejto oblasti by mohol byť venovaný hľadaniu najlepšie antimykoticky pôsobiacej kombinácii prírodných extraktov pre prípravu lipozómov. Čo sa týka vlákien, výskum by mohol smerovať k presnej charakterizácii rozloženia aktívnych látok v štruktúre vlákien a k skúmaniu cytotoxicity PHB vlákien obsahujúcich lipidové rastlinné extrakty. Mohla by byť taktiež skúmaná možnosť kombinácie nanočastíc a nanovlákien v jednom prípravku.



## 7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ZIELINSKA, Aleksandra a Izabela NOWAK. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel carriers for cosmetic ingredients. *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. 2016, **2016**(10), 231–255.
- [2] PARDEIKE, Jana, Aimman HOMMOSS a Rainer MULLER. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, **2009**(366), 170–184.
- [3] ZDRAVEVA, E., J. FANG, B. MIJOVIC a T. LIN. Electrospun nanofibers. *Structure and Properties of High-Performance Fibers*. 2017, **2017**(11), 267–300.
- [4] POLLERA, Bettina, Clare STRACHANB, Roland BROADBENTC a Greg F. WALKER. A minitablet formulation made from electrospun nanofibers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, **2017**(114), 213–220.
- [5] MORSYA, R., M. HOSNYB, F. REICHAB a T. ELNIMRA. Developing a potential antibacterial long-term degradable electrospun gelatin-based composites mats for wound dressing applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2017, **2017**(114), 8–12 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514817300354>
- [6] PEÑA, C., T. CASTILLO, A. GARCÍA, M. MILLÁN a D. SEGURA. *Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1111/1751-7915.12129. ISBN 10.1111/1751-7915.12129. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12129>
- [7] KAVITHA, Ganapathy, Chidambaram KURINJIMALAR, Krishnan SIVAKUMAR, Perumal PALANI a Ramasamy RENGASAMY. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **2016**(89), 700-706 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016304032>
- [8] Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 2017, **2017**(114), 121–143 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216305890>
- [9] Schéma principu elektrostatičkého zvlákňování. In: *Nanopharma* [online]. 2015 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- [10] RIAHI, Daniel N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forcespinning process. *International Journal of Non-Linear Mechanics* [online]. 2017, **2017**(92), 1–7 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020746217301294>
- [11] Forcespinning. In: *Acotex* [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://acotex.blogspot.cz/2015/09/news-fiberio.html>
- [12] HAMAL, Petr a Lucie SVOBODOVÁ. Mykózy a antimykotika. *Interní medicína* [online]. 2011, **2011**(13), 445-449 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/11/07.pdf>

- [13] *Candida albicans*. In: *Shift Frequency: Candida Albicans – The Foundation Of Illness* [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://i0.wp.com/www.shiftfrequency.com/wp-content/uploads/2014/12/Candida.jpg?w=300>
- [14] RICHARDSON, Malcolm a David WARNOCK. *Fungal Infection: Diagnosis and Management, 4th Edition*. 4. Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 978-1-4051-7056-7.
- [15] HABER, Jan. Systémové mykózy a jejich léčba. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-85824-16-7.
- [16] BARTÁKOVÁ, H. a P. CETKOVSKÝ. Invazivní aspergilóza. *Vnitř lék* [online]. 2007, (53), 36 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/pdf?id=v1\\_07\\_13\\_01.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?id=v1_07_13_01.pdf)
- [17] *Aspergillus fumigatus*. In: *Microbe Wiki* [online]. 2016 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/c/c7/A.\\_fumigatus\\_morphology.jpg/500px-A.\\_fumigatus\\_morphology.jpg](https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/c/c7/A._fumigatus_morphology.jpg/500px-A._fumigatus_morphology.jpg)
- [18] TOMŠÍKOVÁ, Alena. *Nebezpečí importovaných mykóz*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 8071844624.
- [19] BETHEA, E. K., B. J. CARVER, A. E. MONTEDONICO a T. B. REYNOLDS. *The inositol regulon controls viability in Candida glabrata* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. ISBN 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.030072-0>
- [20] *Candida glabrata*. In: *Phylomed* [online]. 2014 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.phylomedb.org/sites/default/files/images/candida%20glabrata.preview.jpg>
- [21] Klotrimazol. *BioLib* [online]. 2014 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/dir0/id3938/?elang=SK>
- [22] ALOMRANI, Abdullah H., Mohamed H. AL-AGAMY a Mohamed M. BADRAN. *In vitro skin penetration and antimycotic activity of itraconazole loaded niosomes: Various non-ionic surfactants* [online]. 2015 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.04.009. ISBN 10.1016/j.jddst.2015.04.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224715000726>
- [23] ZHANG, Xiao-Xiao, Qian-Qian SHI, Duo JI, Li-Xin NIU a Yan-Long ZHANG. Determination of the phenolic content, profile, and antioxidant activity of seeds from nine tree peony (*Paeonia* section Moutan DC.) species native to China. *Food Research International* [online]. 2017, **2017**(97), 141–148 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301072>
- [24] CURIN Y., Andriantsitohaina R: Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*, 57(Suppl), 2005, s. 97-107.
- [25] HAN, Fei, Guang-qiang MA, Ming YANG, Li YAN, Wei XIONG, Ji-cheng SHU, Zhi-dong ZHAO a Han-lin XU. *Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano*. DOI: 10.1631/jzus.B1600377. ISBN 10.1631/jzus.B1600377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1600377>
- [26] HAN, Xuesheng a Tory L. PARKER. *Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (Origanum vulgare) essential oil in a human skin disease model*. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.02.005.

- ISBN 10.1016/j.biopen.2017.02.005. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214008517300068>
- [27] Oregano. In: *HerbaZest* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z:  
<https://www.herbazest.com/herbs/oregano>
- [28] REHMAN, Abdul, Malik Hassan MEHMOOD, Muhammad HANEEF, Anwarul Hassan GILANI, Maimoona ILYAS, Bina Shaheen SIDDIQUI a Mansoor AHMED. *Potential of black pepper as a functional food for treatment of airways disorders* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jff.2015.09.006. ISBN 10.1016/j.jff.2015.09.006. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615004235>
- [29] Black pepper. In: *Taste Test: A Guide to Black Pepper* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.seriousseats.com/2012/07/taste-test-black-pepper-what-are-differences-in-varieties.html>
- [30] TSENG, Chih-Hua, Chih-Mei CHENG, Cherng-Chyi TZENG, Shin-I PENG, Chiao-Li YANG a Yeh-Long CHEN. *Synthesis and anti-inflammatory evaluations of  $\beta$ -lapachone derivatives* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.10.047. ISBN 10.1016/j.bmc.2012.10.047. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612008711>
- [31] Lapacho tea. In: *Nutriplanet live healthy* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z:  
<https://www.nutriplanet.org/2014/03/10-reasons-to-drink-lapacho-tea/>
- [32] BAZYŁKO, Agnieszka, Sebastian GRANICA, Agnieszka FILIPEK, Jakub PIWOWARSKI, Joanna STEFAŃSKA, Ewa OSIŃSKA a Anna K. KISS. *Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.07.003. ISBN 10.1016/j.indcrop.2013.07.003. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901300335X>
- [33] Kapucínka. In: *Denník relax* [online]. 2015 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z:  
<http://www.dennikrelax.sk/Zivotny-styl/Zdrava-vyziva-Zdravie/Kapucinka-si-poradi-s-chripkou-i-zapalmi-mocoveho-mechura/>
- [34] CHEN, Xiu-Min, Andrew R. TAIT a David D. KITTS. *Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.016. ISBN 10.1016/j.foodchem.2016.09.016. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616313991>
- [35] 10 Health Benefits Of Orange Peels. In: *Boldsky limitless living* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.boldsky.com/img/2015/02/14-1423904077-coverimage.jpg>
- [36] LORENZ, Peter, Miriam HEINRICH, Manuel GARCIA-KÄUFER, et al. *Constituents from oak bark (*Quercus robur* L.) inhibit degranulation and allergic mediator release from basophils and mast cells in vitro* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.027. ISBN 10.1016/j.jep.2016.10.027. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874116312132>

- [37] Dubová kúra. In: *Newstyle live* [online]. 2016 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://static.newstyle-live.com/wp-content/uploads/2016/10/newstyle-live-10693.jpg>
- [38] GUPTA, Ashish Deep, Vipin Kumar BANSAL, Vikash BABU a Nishi MAITHIL. *Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (Myristica fragrans Houtt)* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jgeb.2012.12.001. ISBN 10.1016/j.jgeb.2012.12.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687157X12000571>
- [39] Muškátový orech. In: *Zámorské objavy* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.zamorske-objavy.wbl.sk/Dovezene-rastliny-a-zivocichy.html>
- [40] YANG, Bin, Bing XIAO a Taoyu SUN. *Antitumor and immunomodulatory activity of Astragalus membranaceus polysaccharides in H22 tumor-bearing mice* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.016. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813013004893>
- [41] Kozinec blanitý. In: *Vivat natura* [online]. 2017 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://img.e-shop.vivatnatura.sk/commodityDetailZoom/images/kozinec%20blanit%20c3%bd.jpg>
- [42] ABDALI, Hanan a Abdellah AJJI. *Development of antibacterial structures and films using clove bud powder* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.050. ISBN 10.1016/j.indcrop.2014.09.050. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014005950>
- [43] Klinčeky. In: *Freshbox* [online]. 2014 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.freshbox.sk/wp-content/uploads/2014/01/Klinceky.jpg>
- [44] RIBEIRO-SANTOS, Regiane, Mariana ANDRADE, Dayana MADELLA, Ana Paula MARTINAZZO, Livia DE AQUINO GARCIA MOURA, Nathália Ramos DE MELO a Ana SANCHES-SILVA. *Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.011. ISBN 10.1016/j.tifs.2017.02.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416304782>
- [45] Škorica. In: *Najrecept.sk* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://najrecept.sk/wp-content/uploads/2014/11/%C5%A1korica.jpg>
- [46] ŠVARC-GAJIĆ, Jaroslava, Aleksandra CVETANOVIĆ, Antonio SEGURA-CARRETERO, Isabel Borrás LINARES a Pavle MAŠKOVIĆ. *Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.12.019. ISBN 10.1016/j.supflu.2016.12.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616304442>
- [47] *Zázvor* [online]. In: . [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: [https://cdn.i0.cz/public-data/06/7c/266ce77e37b49e94c51a3004923f\\_r16:9\\_w1131\\_h636\\_gi:photo:603655.jpg?hash=9dce9fa2d5b523273d153691954fbd0c](https://cdn.i0.cz/public-data/06/7c/266ce77e37b49e94c51a3004923f_r16:9_w1131_h636_gi:photo:603655.jpg?hash=9dce9fa2d5b523273d153691954fbd0c)
- [48] ALY, Soher E., Bassem A. SABRY, Mohamed S. SHAHEEN a Amal S. HATHOUT. *Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (Illicium verum) in vitro* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jssas.2014.05.003. ISBN 10.1016/j.jssas.2014.05.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1658077X14000368>

- [49] Badyán. In: *Herbar rostlin* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.pannacz.com/img/full/1/1583.jpg>
- [50] OSHIO, Tomoyuki, Mayumi KOMINE, Hidetoshi TSUDA, Shin-ichi TOMINAGA, Hirohisa SAITO, Susumu NAKAE a Mamitaro OHTSUKI. *Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. ISBN 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181116308805>
- [51] BONCLER, Magdalena, Marek RÓŻALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Anna PODSEDEK a Cezary WATALA. *Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells: note II* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.vascn.2013.09.003. ISBN 10.1016/j.vascn.2013.09.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871913003006>
- [52] MTT reduction in live cells by mitochondrial reductase results in the formation of insoluble formazan, characterized by high absorptivity at 570 nm. In: *BioTek* [online]. 2017 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://www.biotek.com/resources/application-notes/quantifying-cytotoxicity-of-thiostrepton-on-mesothelioma-cells-using-mtt-assay-and-the-epoch-microplate-spectrophotometer/>
- [53] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014, 2014(108), 479-482 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_05\\_479-482.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf)
- [54] Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemagazín* [online]. 2011, 2011(2), 6-8 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: [http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet\\_Suspenze.pdf](http://www.anamet.cz/sites/all/storage/Anamet_Suspenze.pdf)
- [55] *Pokročilé techniky konfokální mikroskopie: FLIM = FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING MICROSCOPY* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/techniques.php>
- [56] SUHLING, Klaus, Liisa M. HIRVONEN, James A. LEVITT, et al. *Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments* [online]. [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1016/j.medpho.2014.12.001. ISBN 10.1016/j.medpho.2014.12.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213884614000033>
- [57] KANIA, Patrik. *Infračervená spektrometrie* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>
- [58] FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). *Thermofischer Scientific* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html>

- [59] LI, Xueshu, Jaroslav TURÁNEK, Pavlína KNÖTIGOVÁ, et al. *Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants* [online]. [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.04.023. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2009.04.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509001891>

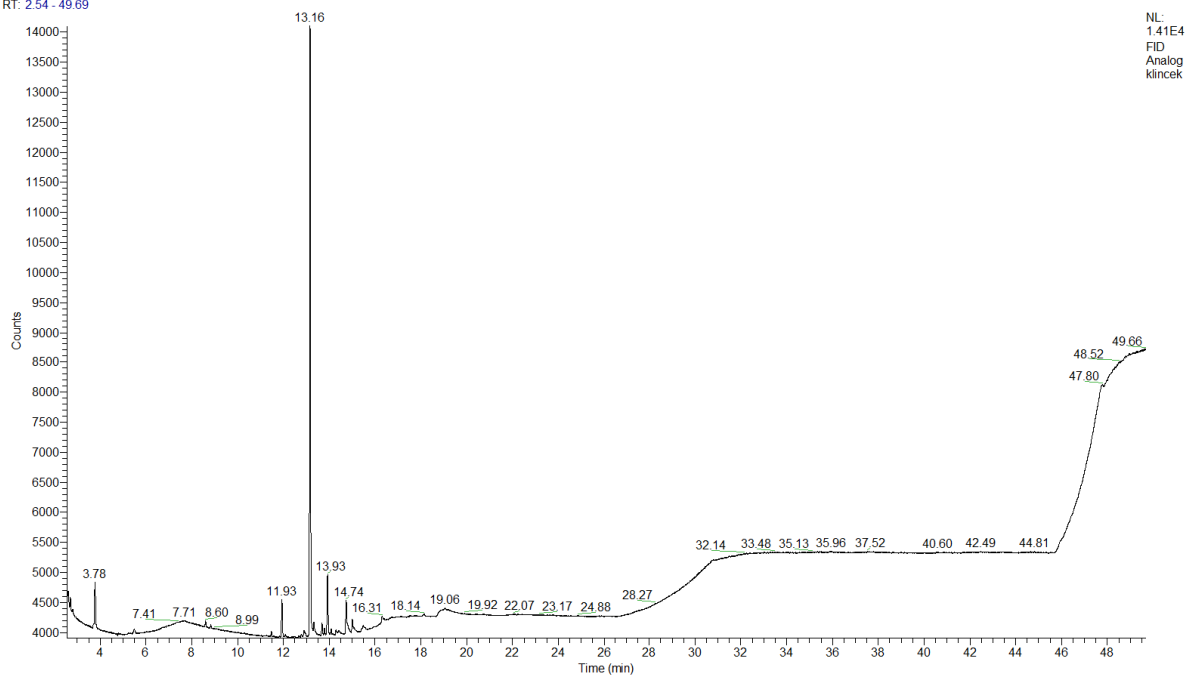
## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A	absorbancia
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) acid
dub	dubová kôra
EÚ	enkapsulačná účinnosť
FLIM	Fluorescence Life Imaging Microscopy
kap	kapucínka
lap	lapacho
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
NR	Nile red (nílska červeň)
OL	olejové lipozómy (obsahujúce lipidový extrakt)
ore	oregano
pep	peper
PHB	polyhydroxybutyrát
ROS	reactive oxygen species (reaktívne formy kyslíka)
TEAB	tetraetylamonium bromid
VL	vodné lipozómy (obsahujúce vodný extrakt)

## 9 PRÍLOHY

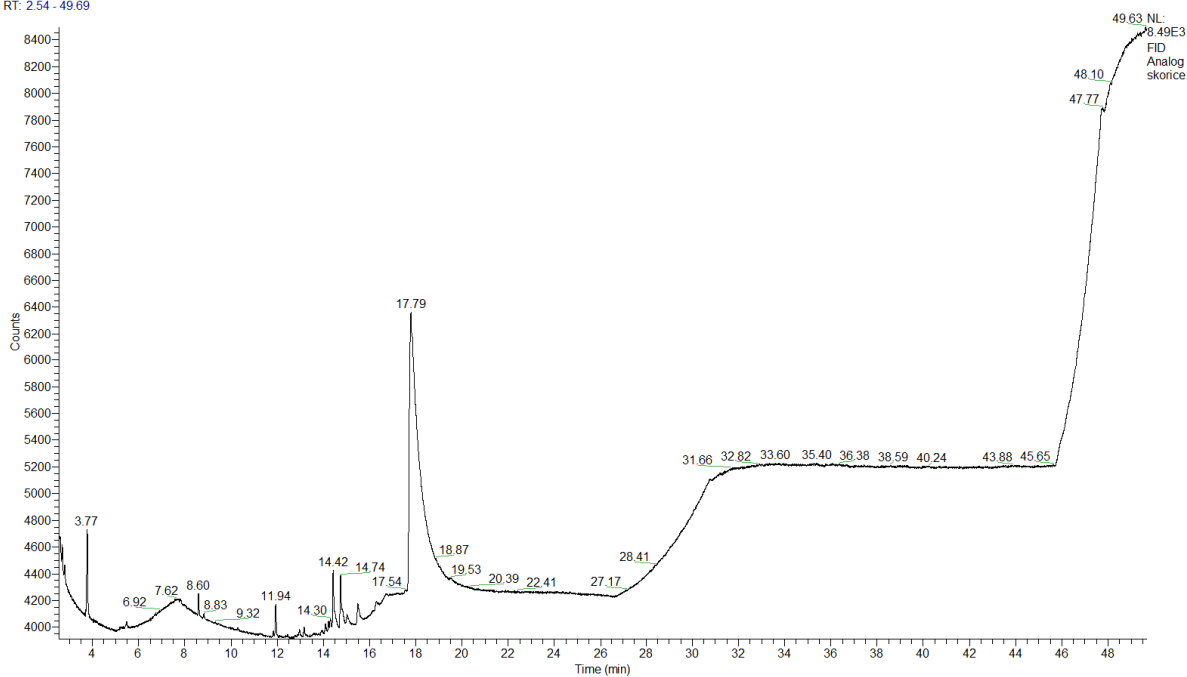
### 9.1 GC/FID spektrá

RT: 2.54 - 49.69



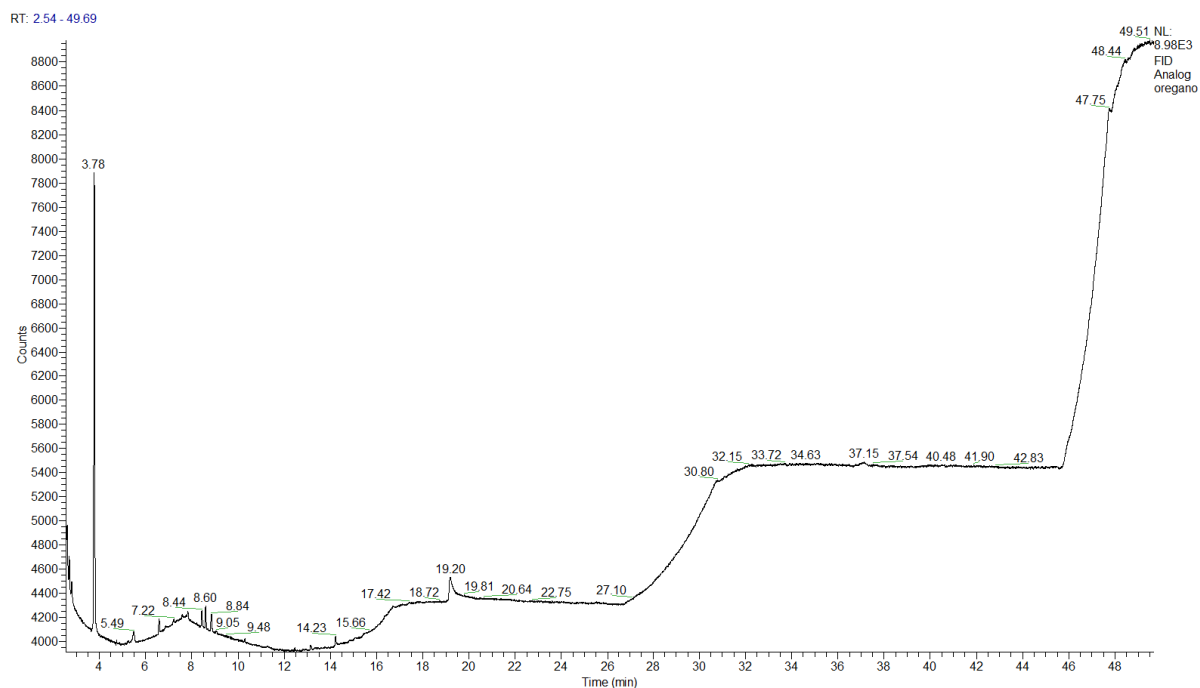
Obrázok 65: Klinček

RT: 2.54 - 49.69

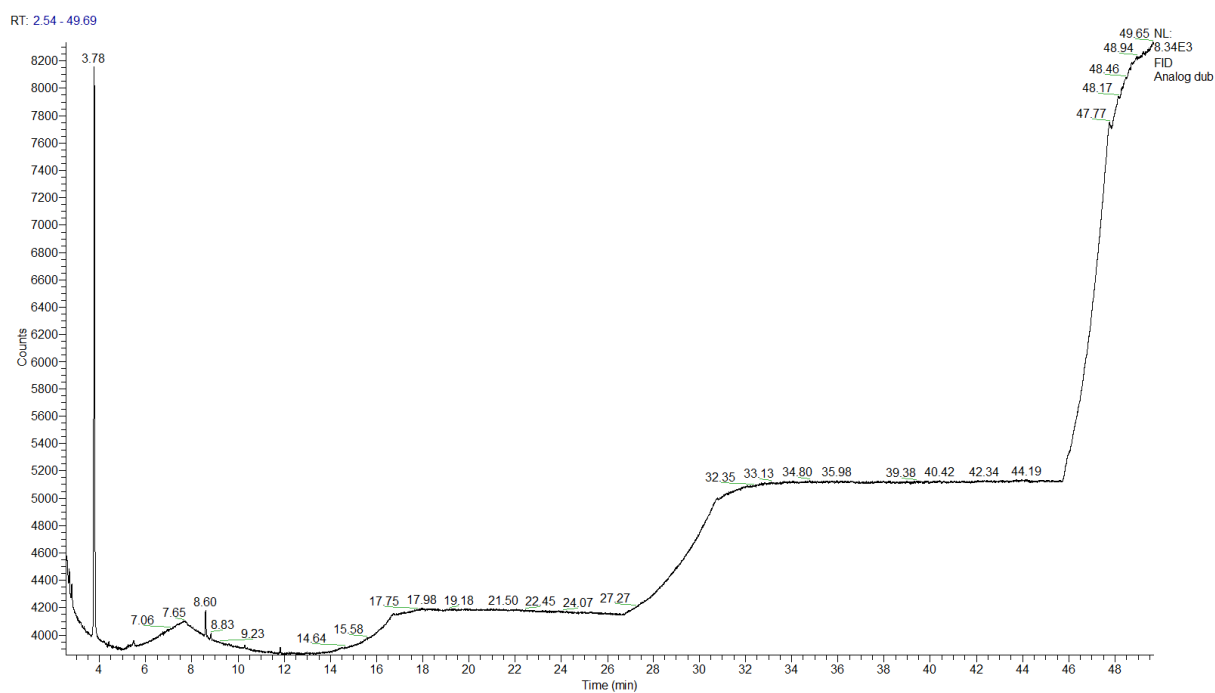


Obrázok 66: Škorica



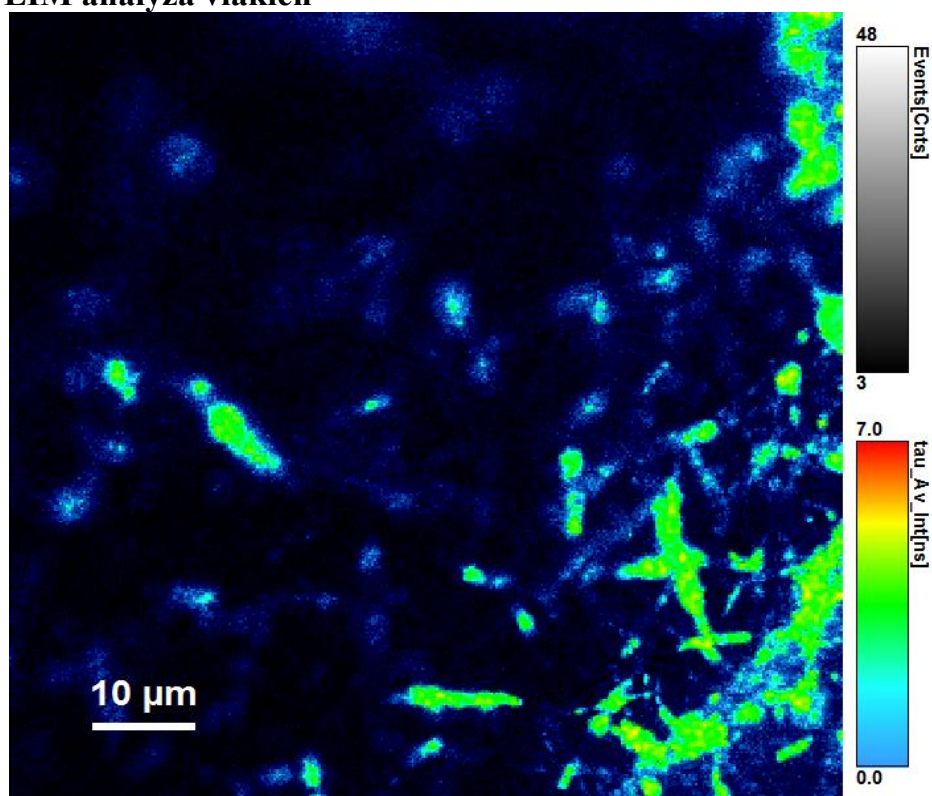


Obrázok 67: Oregano

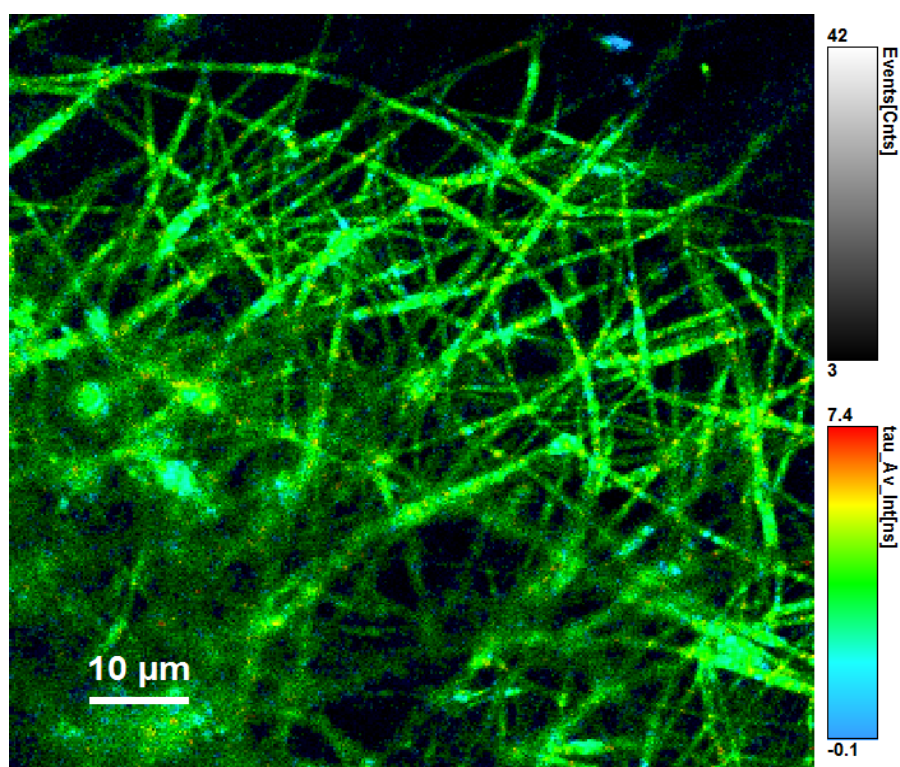


Obrázok 68: Dubová kôra

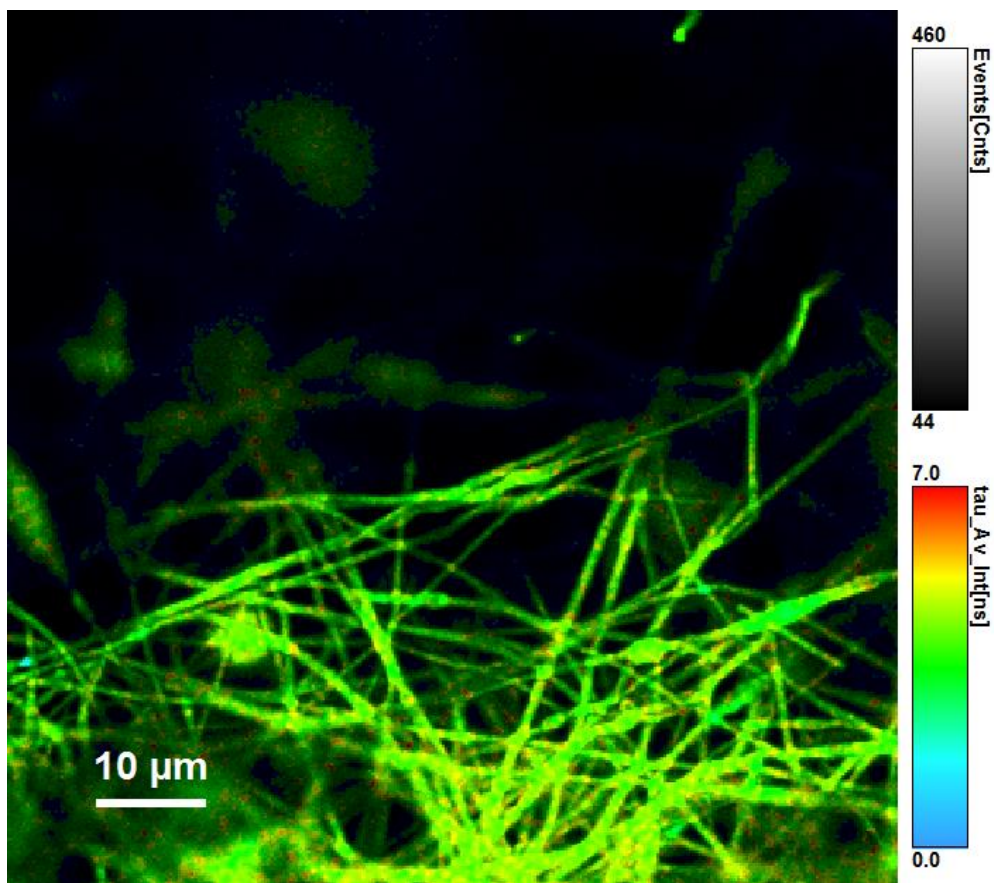
## 9.2 FLIM analýza vlákien



Obrázok 69: PHB vlákna



Obrázok 70: PHB vlákna s extraktom z klinčekov



Obrázok 71: PHB vlákna s extaktom zo škorice